



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

Imunomodulační vlastnosti mastných kyselin s krátkým řetězcem tvořených *Escherichia coli*

Immunomodulatory properties of short chain fatty acids synthesized in *Escherichia coli*

Bakalářská práce

Studijní program: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví

Autor bakalářské práce: Dana Burešová

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Jiří Hrdý, Ph.D.

Kladno 2022

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Burešová** Jméno: **Dana** Osobní číslo: **496191**
Fakulta: **Fakulta biomedicínského inženýrství**
Garantující katedra: **Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**
Studijní program: **Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**

II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

Imunomodulační vlastnosti mastných kyselin s krátkým řetězcem tvořených Escherichia coli

Název bakalářské práce anglicky:

Immunomodulatory Properties of Short Chain Fatty Acids Synthesized in Escherichia Coli

Pokyny pro vypracování:

V teoretické části bakalářské práce bude provedena literární rešerše schopnosti bakterií tvořit mastné kyseliny s krátkým řetězcem. Speciální pozornost bude věnována recentním poznatkům popisujícím schopnost E. coli tyto mastné kyseliny s krátkým řetězcem tvořit. Praktická část bakalářské práce bude pojednávat o stanovení imunomodulačních vlastností E. coli O83:K24:H31 přítomné v probiotické vakcíně Colinfant Newborn. Různé koncentrace bakteriálních supernatantů obsahujících metabolity budou přidány k vyizolovaným frakcím mononukleárních leukocytů získaných z buffy coatů lidské periferní krve. Bude sledován vliv metabolitů na změnu genové exprese, která bude kvantifikována pomocí polymerázové řetězové reakce v reálném čase.

Seznam doporučené literatury:

- [1] ZHAO, Chunhua, Hongjun DONG, Yanping ZHANG a Yin LI, Discovery of potential genes contributing to the biosynthesis of short-chain fatty acids and lactate in gut microbiota from systematic investigation in E. coli, Npj Biofilms and Microbiomes, ročník 5, číslo 1, 2019, ISSN 2055-5008
- [2] NAKKARACH, Atchareeya, Hooi Ling FOO, Adelene Ai-Lian SONG, Sunee NITISINPRASERT a Ulaiwan WITHAYAGIAT, Promising discovery of beneficial Escherichia coli in the human gut, Biotech, ročník 10, číslo 7, 2020, ISSN 2190-572X.
- [3] RAU, Monika, Ateequr REHMAN, Marcus DITTRICH, et al., Fecal SCFAs and SCFA-producing bacteria in gut microbiome of human NAFLD as a putative link to systemic T-cell activation and advanced disease., United European Gastroenterology Journal, ročník 6, číslo 10, 2018, ISSN 2050-6406

Jméno a příjmení vedoucí(ho) bakalářské práce:

doc. RNDr. Jiří Hrdý, Ph.D.

Jméno a příjmení konzultanta(ky) bakalářské práce:

Datum zadání bakalářské práce: **20.09.2021**

Platnost zadání bakalářské práce: **22.09.2023**

doc. Mgr. Zdeněk Hon, Ph.D.
vedoucí katedry

prof. MUDr. Jozef Rosina, Ph.D., MBA
děkan

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Imunomodulační vlastnosti mastných kyselin s krátkým řetězcem tvořených *Escherichia coli* vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

V Kladně dne 12.05.2022

.....
Dana Burešová

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat vedoucímu této bakalářské práce doc. RNDr. Jiřímu Hrdému, Ph.D. za jeho trpělivost, cenné rady a připomínky při sepisování této práce. Velké díky patří také členům Ústavu imunologie a mikrobiologie 1. lékařské fakulty UK, a to konkrétně Ing. Petře Petráskové a Mgr. Olze Novotné za jejich ochotu a pomoc při zpracování praktické části.

ABSTRAKT

Probiotické bakterie mají spousty pozitivních dopadů na lidský organismus. Bakterie samotné nebo jejich metabolity jsou schopny stimulovat náš imunitní systém a genovou expresi cytokinů. Většina výzkumů probiotik v dnešní době se zaměřuje na jejich využití v léčbě astmatu, alergie a jejich působení proti zánětlivým onemocněním. Tato práce poskytuje přehled o nejznámějších probiotických přípravcích a jejich vlivech na imunitní systém.

Pro lepší pochopení působení bakterie *E. coli* a jejich metabolitů na lidský imunitní systém byly testovány její imunomodulační vlastnosti na izolovaných buňkách mononukleární frakce z buffy coatu. Konkrétně byla sledována schopnost různých koncentrací metabolitů, produkovaných v anaerobní a aerobní kultivaci *E. coli* stimulovat hladiny vybraných zánětlivých a prozánětlivých cytokinů. Všechny hladiny cytokinů byly měřeny pomocí polymerázové řetězové reakce.

Výsledkem této práce jsou grafy, ukazující hladiny cytokinů po přidání stimulatorů v porovnání s nestimulovanými buňkami. Je patrné, že metabolity z anaerobní kultivace *E. coli* AN 200 a AN 40 zvyšují genovou expresi *Il10* a metabolity z aerobní kultivace *E. coli* AE 200 a AE 40 zvyšují genovou expresi *Ifnγ* a *Il2*. Tyto zmíněné cytokiny IL-10, IL-2 a IFN γ podporují Th1 imunitní odpověď, která hraje důležitou roli při autoimunitních odpovědích. Z tohoto můžeme usuzovat, že zmíněné metabolity by mohly být v budoucnu použity v probiotických produktech na léčbu zánětů (hlavně trávicího traktu) a alergií.

Klíčová slova

E. coli; imunomodulace; cytokiny; imunitní systém; probiotika

ABSTRACT

Probiotic bacteria have positive impact on the human body. Bacteria themselves or their metabolites are able to stimulate our immune system and cytokine gene expression. Most research on probiotics today focuses on their use in the treatment of asthma, allergies and their action against inflammatory diseases. This work provides an overview of the most well-known probiotic vaccines and their effects on the immune system.

To better understand the effects of *E. coli* and their metabolites on the human immune system, its immunomodulatory properties were tested on isolated cells of the mononuclear fraction from the buffy coat. Specifically, the ability of various concentrations of metabolites produced in anaerobic and aerobic culture of *E. coli* to stimulate the levels of selected anti-inflammatory and proinflammatory cytokines was studied. All cytokine levels were measured by polymerase chain reaction.

The result of this work are graphs showing cytokine levels after the addition of stimulators in comparison with unstimulated cells. It can be seen that metabolites from *E. coli* anaerobic culture AN 200 and AN 40 upregulate *Il10* gene expression and metabolites from aerobic *E. coli* culture AE 200 and AE 40 upregulate *Ifng* and *Il2* gene expression. Cytokines IL-10, IL-2 and IFN γ support the Th1 immune response, which plays an important role in autoimmune responses. From this we can conclude that the metabolites tested could be used in the future in probiotic supplements for the treatment of inflammation (mainly of the digestive tract) and allergies.

Keywords

E. coli; immunomodulation; cytokines; immune system; probiotics

Obsah

1	Úvod	10
2	Cíle práce.....	11
3.	<i>Escherichia coli</i>	12
3.1.	Antigenní struktura	12
3.1.1	O - antigen	12
3.1.2	H - antigen	12
3.1.3	K - antigen	13
3.2	Vztah hostitele s <i>E. coli</i>	13
3.3	Patogenita.....	14
3.4.	Výzkum.....	15
3.4.1	Oblasti výzkumu	16
4.	Mastné kyseliny s krátkým řetězcem	17
4.1	Typy SCFA.....	18
4.1.1	Acetát	18
4.1.2	Propionát.....	19
4.1.3	Butyrát.....	20
4.2	Vlivy na produkci SCFA.....	20
4.2.1	pH	20
4.2.2	Střevní plyny.....	21
4.2.3	Železo	21
4.3.	Cross-talk.....	21
4.2.1	Interakce mezi střevním epitelem a imunitním systémem	22
4.2.2	Interakce mezi střevním epitelem a komenzálními bakteriemi	22
4.2.3	Interakce mezi imunitním systémem a komenzálními bakteriemi.....	22

5	Imunitní systém.....	24
5.1	Přírozená imunita.....	24
5.2	Specifické (adaptivní) mechanismy	25
5.3	Dendritické buňky.....	25
5.4	Alergie.....	26
5.5	Cytokiny	26
5.5.1	Klasifikace cytokinů	27
5.5.2	Interleukin 1 (IL-1).....	28
5.5.3	Interleukin 2 (IL-2).....	28
5.5.4	Interleukin 4 (IL-4).....	28
5.5.5	Interleukin 10 (IL-10).....	28
5.5.6	Interleukin 13 (IL-13).....	29
5.5.7	Interleukin 17 (IL-17).....	29
5.5.8	Interferon gama (IFNg).....	29
5.	Probiotika	30
5.6	Historie	30
5.7	Působení probiotik.....	30
5.8	Probiotika a imunitní systém	31
5.9	Prebiotika.....	32
5.10	Druhy probiotik.....	33
5.11	Probiotické druhy <i>E. coli</i> a jejich přípravky	34
5.11.1	Mutaflor.....	34
5.11.2	Symbioflor 2.....	35
5.11.3	Colinfant Newborn	35
6	Metodika	36
6.1	Izolace buněk z buffy coatu	36

6.2	Stanovení viability a počtu buněk	38
6.2.1	Viabilita.....	38
6.2.2	Počet buněk.....	38
6.3	Stimulace buněk v termostatu	39
6.4	Izolace RNA	40
6.4.1	Měření koncentrace RNA	41
6.5	Přepis RNA na cDNA	43
6.6	RT-PCR.....	44
7	Výsledky	45
7.1	Vliv metabolitů na změnu genové exprese v PBMC po 1 hodině stimulace	45
7.2	Vliv metabolitů na změnu genové exprese v PBMC po 4 hodinách stimulace	47
8	Diskuze	50
9	Závěr.....	55
10	Seznam použitých zkratk.....	56
11	Seznam použité literatury	58
12	Seznam použitých obrázků.....	68
13	Seznam použitých tabulek	69

1 ÚVOD

Lidské tělo je domovem pro širokou škálu mikroorganismů od komenzálních, symbiotických až po patogenní mikroorganismy. Tyto mikroorganismy, které souhrnně označujeme jako mikrobiotu, osidlují naši kůži, nos, plíce, ústa, ale především náš gastrointestinální trakt (GIT), kde se vyskytuje velké množství rozličných druhů bakterií. GIT s bakteriemi a imunitním systémem spolu komunikují pomocí tzv. cross-talku, a tím ovlivňují pochody v lidském těle. Tato komunikace hraje stěžejní roli při ovlivňování metabolismu, regulaci endokrinních, metabolických a imunitních funkcí a ochraně proti patogenům.

Probiotika jsou živé organismy, které, jsou-li podávány v adekvátním množství, přispívají ke zlepšení zdravotního stavu hostitele. Nejčastějšími probiotiky jsou bakterie mléčného kvašení *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, které se nacházejí v mléčných výrobcích. Kmeny bakterie *E. coli* se jako probiotikum objevují ve 3 komerčních produktech - Mutaflor, Symbioflor 2 a Colinfant Newborn. Probiotika mají pestrou škálu působení – od protizánětlivého po imunostimulační.

Jedním z prospěšných účinků probiotických bakterií je ovlivňování sekrece cytokinů v buňkách imunitního systému. V následujícím textu budou probrány způsoby, jakými bakterie, případně jejich metabolity, stimulují cytokiny, a tím ovlivňují celý organismus hostitele.

2 CÍLE PRÁCE

V teoretické části bakalářské práce bude provedena literární rešerše na schopnost bakterií tvořit mastné kyseliny s krátkých řetězcem. Speciální pozornost bude věnována recentním poznatkům popisujícím schopnost *E. coli* tyto mastné kyseliny s krátkým řetězcem tvořit. V následujícím textu se budeme soustředit na vliv probiotické *E. coli* na imunitní systém.

Cílem praktické části bude sledovat vliv různých koncentrací metabolitů anaerobní a aerobní kultivace *E. coli* na změnu genové exprese vybraných cytokinů v buňkách lidské periferní krve. Výsledné hladiny genové exprese vybraných cytokinů u stimulovaných buněk lidské periferní krve budou porovnávány s nestimulovanou kontrolou. V závěru budou navrženy možnosti využití pro metabolity z *E. coli*.

3. ESCHERICHIA COLI

Escherichia coli (*E. coli*) klasifikujeme jako gramnegativní tyčku z čeledi *Enterobacteriaceae*. Ve svých rozměrech se liší v závislosti na kmenu a podmínkách, ve kterých se vyskytuje. V průměru však měří 1 µm na délku a 0,35 µm na šířku. K pohybu využívá bičíky nebo vlasové pili, které zároveň může využít k zachycení na buňkách hostitele. Jedná se o fakultativního aeroba, který se vyznačuje schopností růstu v přítomnosti i nepřítomnosti kyslíku. Nemůže však růst při vysokých teplotách ani pH. [1] Tato bakterie osidluje především spodní část střevního traktu u teplotokrevných živočichů. Jedná se o unikátní druh bakterie zahrnující kmeny komenzální, tedy pro člověka neškodné a kmeny patogenní, které mají schopnost způsobit střevní nebo extraintestinální onemocnění jak u lidí, tak u zvířat. [2]

3.1. Antigenní struktura

3.1.1 O - antigen

O - antigen je povrchový somatický polysacharid gramnegativních bakterií, který má extrémní variabilitu. Tato variabilita bakteriálního povrchu poskytuje různým druhům výhodu, při uchycení na konkrétním místě v hostiteli. Jakožto hlavní povrchový antigen hraje hlavní roli ve spojení patogen-hostitel. O - antigen slouží k sérotypizaci bakteriálního kmene. O - antigeny jsou typickými endotoxiny a důležitými faktory virulence, které jsou cílem adaptivního a vrozeného imunitního systému. Tyto endotoxiny jsou toxické a setkáváme se u nich se schopností vyvolat akutní hypoglykémii, hypotenzi, diseminovanou intravaskulární koagulaci (DIC) a možností aktivovat komplement alternativní dráhou. [66]

3.1.2 H - antigen

H - antigen je proteinový antigen, který má bičíkovou strukturu. Vyskytuje se u pohyblivých kmenů *E. coli* a zajišťuje jejich mobilitu. Taktéž slouží k sérotypizaci kmene. [67]

3.1.3 K - antigen

K - antigeny představují složky bakteriálního pouzdra (kapsle), které je na povrchu bakterie mimo bakteriální stěnu. Obvykle se jedná o vysokomolekulární polysacharidy, které mají za úkol ochranu bakterie. Jedná se o důležitý faktor virulence, protože chrání bakterii před složkami komplementu, a díky své hydrofobní povaze umožňuje bakteriím uniknout před pohlcením fagocytem. [66]

3.2 Vztah hostitele s *E. coli*

První kontakt hostitele s *E. coli* je hned po narození, kdy jsou novorozenci osidlování *E. coli* od matky. [32] Tento proces časně kolonizace střev kojenců je velmi důležitý. *E. coli* mění strukturu a funkci epitelu ve střevech, a tím ovlivňuje vývoj mikrobioty. [33] Problém nastává v západních zemích, kde čím dál tím více dětí přichází na svět porodem císařským řezem. [34] Pokud dítě není osídleno mateřskou mikrobiotou s *E. coli* hned po narození, dochází k nevýhodným změnám a vývoji mikrobioty včetně nastavení vzájemných rovnovážných interakcí mezi mikrobiotou a imunitním systémem hostitele. Mezi tyto změny patří například zvýšená kolonizace střev bakterií *Staphylococcus aureus*, který je spojován s nemocemi jako astma, obezita a cukrovka. [35,36]

Vztah mezi hostitelem a komenzální *E. coli* je prospěšný pro oba dva zúčastněné. Zatímco hostitel poskytuje přísun potravy a místo pro přežití, *E. coli* zajišťuje produkci vitamínu K, který je důležitý pro srážení krve, při růstu buněk a kostní mineralizaci. Dalším vitamínem, který *E. coli* produkuje je B12, který plní funkci při krvetvorbě a pomáhá nervovým buňkám. [2]

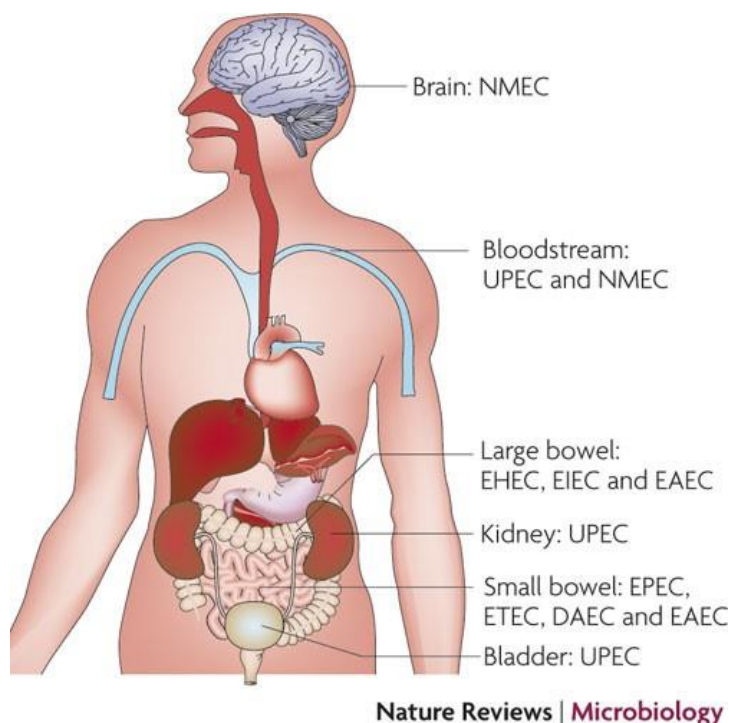
Vzhledem k vlastnosti *E. coli* tvořit vícero fenotypů, je vhodným modelovým organismem pro výzkum evoluce bakterií nebo adaptace na různé životní podmínky. Nejvíce nás tedy zajímá její univerzalita a genetická výbava, která jí umožňuje adaptaci v různých životních podmínkách a může způsobit změnu z neškodného kmene na nebezpečný patogenní kmen. [9] O patogenitě bakterie *E. coli* bude pojednáno v další kapitole.

3.3 Patogenita

Nové patogenní kmeny vznikají díky schopnosti *E. coli* přijmout novou genetickou informaci. Rozsah genetické výbavy patogenních kmenů bývá o 1 000 000 bp DNA, což je o poznání větší než genetická výbava kmenů nepatogenních, jejichž genom čítá okolo 4 500 000 bp. V patogenitě *E. coli* hrají největší roli její virulentní determinanty, které pomáhají poškozovat hostitelské buňky. Faktory virulence umožňují např.: adhezi na hostitelské buňky a následné vniknutí, vstříknutí toxinu do buňky, vázat a získat železo z červených krvinek. [2,9]

Patogenní kmeny *E. coli* kolonizují různá místa v těle. Tenké střevo je kolonizováno Enteropatogenní (EPEC), Enterotoxigenní (ETEC) a difuzně adherentní *E. coli* (DAEC), které způsobují průjmové stavy. Tlusté střevo bývá osídleno Enterohemoragickými (EHEC) a Enteroinvazivními kmeny *E. coli* (EIEC). Jsou zde i kmeny, které mohou kolonizovat jak tenké, tak tlusté střevo např.: EAEC – Enteroagregativní *E. coli*. Uropatogenní *E. coli* (UPEC), které nacházíme v močovém traktu, z něhož cestuje do močového měchýře, kde je příčinou cystitidy. Při žádné nebo nesprávné léčbě stoupá dál do ledvin a způsobuje pyelonefritidu. Kmen NMEC (Newborn Meningitis *E. coli*) se může dostat do centrálního nervového systému přes hematoencefalickou bariéru, kde způsobuje meningitidu. Všechny stavy jsou zaznamenány na obrázku 1. [10]

Nejznámější patogenní enterohemoragický kmen je *E. coli* O157:H7. Tento kmen produkuje toxickou látku, která napadá malé cévy a zabíjí střevní buňky. Následkem jsou bolesti břicha, které mohou být doprovázeny krvavým průjmem. Tento stav v některých případech může vést k trombocytopenii, selhání ledvin a smrti. Léčba bývá komplikovaná, protože antibiotika nezabírají, ba naopak zvyšují riziko hemolyticko-uremického syndromu (HUS). [31]



Obrázek 1: Různé patogenní kmeny *E. coli* kolonizující lidské tělo [10]

NMEC – kmeny způsobující novorozeneckou meningitidu; napadají mozek (Brain) a mohou postihnout i krevní oběh (Bloodstream)

UPEC – kmeny uropatogenní; napadají krevní oběh, ledviny (Kidney) a močový měchýř (Bladder)

EHEC - enterohemoragické kmeny; kolonizují tlusté střevo (Large Bowel)

EIEC – enteroinvazivní kmeny; kolonizují tlusté střevo (Large Bowel)

EAEC – enteroagregativní kmeny; kolonizují tlusté střevo (Large Bowel)

EPEC – enteropatogenní kmeny; postihují tenké střevo (Small Bowel)

ETEC – enterotoxigenní kmeny; postihují tenké střevo (Small Bowel)

DAEC – difuzně adherentní kmeny; postihují tenké střevo (Small Bowel)

3.4. Výzkum

Jako první začal této bakterii věnovat pozornost Theodor Escherich, který na konci 19. století studoval mikrobiotu ve střevech novorozenců. Pojmenoval ji jako *Bacterium coli commune*. [30]. Bakterie dnes známá jako *Escherichia coli* je v moderní technologii doslova klíčová. Vědci jí označují jako „laboratorního mazlíčka“. Z různých kmenů *E. coli* odebíráme geny, u kterých nechceme, aby se replikovaly dále. Naopak jsme se naučili vkládat nové sekvence DNA z jiných organismů do bakteriálního plazmidu, a tím oklamat *E. coli*, aby vyrobila bílkovinu, kterou chceme produkovat a zkoumat. Jedním z příkladu rekombinace je inzulin, který získáváme ze slinivky prasete. [8]

Proč zrovna *E. coli*:

- Jedná se o střevní bakterii, která roste nejlépe při tělesné teplotě (cca 37,4° C), což je teplota, kterou díky termostatu v laboratoři snadno zařídíme.
- Není náročná na výživu – energii je schopna získat z více zdrojů. V přirozeném prostředí (střeva) konzumuje natrávenou potravu, mimo střeva (v laboratoři) jsme schopni zdroje energie nahradit snadno a levně.
- Kyslík taky nehraje roli – může růst s ním ale i bez něj. Ve střevech roste anaerobně (bez přísunu kyslíku), ovšem v laboratoři může růst i aerobně (za přísunu kyslíku).
- Rychlý růst – za ideálních podmínek se za 20 minut dokáže počet buněk zdvojnásobit. [8]

3.4.1 Oblasti výzkumu

Svůj hlavní podíl ve výzkumu má určitě v oblasti molekulární biologie a genetiky. Pomohla k objasnění genetického kódu, replikace DNA i transkripce, dále k vyjasnění struktury a funkce ATP (adenosintrifosfát) syntázy. Díky *E. coli* se genové inženýrství posunulo na vyšší úroveň, za pomoci molekulárního klonování, rekombinantní DNA a objevu restrikčních enzymů. [39]

Další oblast pokroku díky *E. coli* zaznamenala i farmaceutika. Syntéza rekombinantních enzymů *in vivo* nám pomohla k výrobě inzulínu (léčba diabetu), sklerózy), erythropoetinu (anémie), lidského růstového hormonu (poruchy hypofýzy) a mnoho dalších. [39]

V oblasti biotechnologií se používá při výrobě biopaliv, průmyslových chemikálií, jako jsou fenol, etanol, manitol a další. [39]

4. MASTNÉ KYSELINY S KRÁTKÝM ŘETĚZCEM

Až v období druhé světové války se začal klást důraz na výzkumu lipidů a mastných kyselin. Zjistilo se, že tyto složky mikroorganismů jsou metabolicky aktivnější a chemicky složitější, než se doposud očekávalo. Bohužel i v dnešní době výzkumu lipidů, a tedy i mastných kyselin, výrazně zaostává za pokrokem ve studiu sacharidů a bílkovin. Existují tři hlavní důvody, proč máme o metabolismu lipidů tak málo informací. Až do nedávna nebyly přístupné tak efektivní techniky pro izolaci, čištění a identifikaci lipidů. Mezi hlavní komplikace ale patří špatné fyzikální vlastnosti lipoidních materiálů, jako například nízká rozpustnost ve vodě. Posledním důvodem je fakt, že lipidy jsou z chemického a fyziologického hlediska pro výzkum nejméně zajímavé. [3]

Mastné kyseliny jsou karboxylové kyseliny s alifatickým řetězcem, které můžeme rozdělit na nasycené a nenasycené. Podle délky jejich alifatických řetězců lze mastné kyseliny klasifikovat jako mastné kyseliny s řetězcem krátkým (<6 C), středním (6–12 C) nebo dlouhým (>12 C). [89]

Mastné kyseliny s krátkých řetězcem (SCFA – Short Chain Fatty Acids) tvoří soli - formiát (C1), acetát (C2), propionát (C3), butyrát (C4) a valerát (C5). SCFA jsou konečným produktem fermentace nestravitelných sacharidů (NDC – Non-Digestible Carbohydrates), které tvoří hlavní zdroj výživy pro buňky tlustého střeva. Poslední výzkumy ukazují, že se jedná o přirozené ligandy pro receptory volných mastných kyselin (FFAR 2/3 – Free Fatty Acids Receptors), které můžeme najít na různých typech buněk, včetně těch imunitních. Tyto receptory by mohly být cílem léčebných postupů při terapii obezity, astmatu, kolitidy a rakoviny tlustého střeva. Studium FFAR se snažíme lépe pochopit souvislost mezi příjmem potravy, funkcí střevní mikrobioty a celkového významu těchto receptorů pro zdraví. Ukázalo se, že dlouhodobé stravování potravou s vysokým obsahem vlákniny je spojeno s lepšími zdravotními výsledky. Mezi hlavní zdroje vlákniny patří ovoce, zelenina a luštěniny. Důležité je také zlepšení chápání v oblasti molekulární signalizace mezi hostitelem a mikrobiomem, který

označujeme jako „cross-talk“. [4,5] O detailnějším působení „cross-talku“ bude pojednávat konec této kapitoly.

Množství SCFA ve střevech můžeme ovlivňovat příjmem potravy. SCFA se vyskytují především v nestravitelných sacharidech, tucích a bílkovinách. Mezi hlavní producenty SCFA patří *Bacteroidetes* (produkce acetátu a propionátu) a *Firmicutes* (produkce butyrátu). Ve střevech je nejčtenější solí SCFA acetát, který je produkován z acetyl-CoA glykolýzou. Propionát a butyrát můžeme získat z metabolismu sacharidů i metabolismu aminokyselin. [84]

SCFA významně ovlivňují lidské zdraví a hrají roli v některých nemocech. SCFA inhibují histondeacetylázy (HDAC), regulují vrozené a adaptivní reakce imunitního systému tím, že signalizují toll-like přes receptory (TLR) a podporují produkci některých cytokinů. SCFA mají pozitivní vliv na léčbu Crohnovy choroby (CD), ulcerózní kolitidy (UC) a různých průjmových stavů, které souvisejí s antibiotiky. Ukázalo se, že SCFA modulují expresi genů střevních patogenů (např. EHEC, *Salmonella*, *Klebsiella*). [84]

Pokud dochází ke změnám složení střevní mikrobioty nebo ke změnám v jejích funkcích, hovoříme o tzv. dysbióze. S takovými změnami jsou spojeny nemoci jako idiopatické střevní záněty (IBD) nebo karcinom kolorekta (CRC – Colorectal cancer). Pacienti s těmito nemocemi mají snížený počet bakterií, které produkují SCFA zejména ty, co produkují butyrát (*Roseburia intestinalis*, *Eubacterium rectale*, *Firmicutes*). [84]

4.1 Typy SCFA

4.1.1 Acetát

Acetát je sůl kyseliny octové, která je produkována střevními bakteriemi, především *Prevotella spp.*, *Ruminococcus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Bacteroides spp.*, *Clostridium spp.*, *Streptococcus spp.*, *A. muciniphila* a *B. hydrogenotrophica*. Acetát může vznikat dvěma cestami. První možností je vyrobit acetyl-CoA dekarboxylací pyruvátu a poté ho hydrolyzovat na acetát pomocí hydrolázy. Tuto cestu využívají výše zmíněné bakterie.

Druhou možností je redukce oxidu uhličitého za vzniku oxidu uhelnatého, který vstupuje do reakce s molekulou koenzymu A a methylovou skupinou za vzniku acetyl-CoA. Takto vzniklý acetyl je substrátem pro získání acetátu. Touto drahou získávají acetát acetogenní bakterie. [89,90]

Poslední studie ukazují, že acetát snižuje chuť k jídlu přímým dopadem na hypotalamus, zvyšuje schopnost jater vychytávat cholesterol z krve, inhibuje endogenní lipolýzu a snižuje hyperglykémii. [89,90]

4.1.2 Propionát

Sůl kyseliny propionové - propionát je produkován hned několika bakteriálními kmeny. Ovšem jeho syntéza je na rozdíl od acetátu více konzervovaná a substrátově specifická. První způsob jeho tvorby je cestou sukcinátovou, ve které se využívá fosfoenolpyruvát (PEP), který je karboxylován na oxalacetát a ten je postupně přeměněn na malát a fumarát. Fumarát přijímá elektrony z koenzymu NADH pomocí reduktázy a NADH dehydrogenázy. NADH dehydrogenáza je schopná transportovat protony přes buněčnou membránu. Sukcinát následně vzniká jako výsledek fumarát reduktázy. Sukcinát se poté za nízkého parciálního tlaku oxidu uhličitého přemění na methylmalonát, který se mění na výsledný propionát. Tuto cestu tvorby propionátu využívají *Bacteroidetes* a některé *Firmicutes*. [89]

Další možnou cestou pro syntetizaci propionátu je cesta akrylátová, která redukuje laktátu na propionát pomocí laktoyl-CoA dehydrogenázy. Tento způsob tvoření je pouze u malého počtu bakterií, můžeme ho najít například u *Coprococcus catus*. [89]

Poslední možnou cestou je propandiolová dráha. Deoxy cukry (např. rhamnóza, fukóza) mohou tvořit 1,2-propandiol, který se postupně přeměňuje na propinaldehyd a propionyl-CoA, což vede ke tvorbě propionátu. Mezi bakterie využívající tuto dráhu patří *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, *R. inulinivorans* a *Akkermansia muciphilla*, který se zdá být hlavním druhem produkujícím propionáty. [89]

4.1.3 Butyrát

Butyrát sodný je sůl kyseliny máselné. Jeho účinky na organismus jsou velmi široké. Reguluje tvorbu zánětlivých cytokinů nebo zvyšuje produkci antibakteriálních peptidů. Je schopen zastavit proliferaci nádorových buněk nebo indukovat apoptózu pomocí ovlivnění genové exprese. Poslední studie ukazují, že expozice butyrátu během diferenciací makrofágů zvyšuje antimikrobiální aktivitu. [6]

Syntéza butyrátu je stejně konzervativní a substrátově specifická jako propionátová syntéza. Ke tvorbě butyrátu nejvíce přispívá fermentace rezistentního škrobu, jehož hlavním producentem je *Ruminococcus bromii*. [89]

K syntéze butyrátu je v první řadě třeba kondenzovat dvě molekuly acetyl-CoA, aby došlo k vytvoření acetoacetyl-CoA. Následně dochází k jeho redukcí na β -hydroxybutyryl-CoA, krotonyl-CoA a butyryl-CoA. Z butyryl-CoA lze butyrát syntetizovat dvěma způsoby. V prvním, označovaném jako klasická cesta, jsou za konverzi zodpovědné enzymy fosfotransbutyryláza a butyrátkináza. Tato cesta je omezená pouze na některé druhy *Coproccoccus*. Druhou možností syntézy je přeměnit butyryl-CoA na butyrát a acetyl-CoA pomocí transferázy. Tato cesta je preferována lidskou střevní mikroflórou více než klasická. Objevuje se u *F. prausnitzii*, *E. rectale*, *E. hallii* a *R. bromii*, které se zdají být hlavními producenty butyrátu. [89]

Na všechny tyto soli SCFA působí okolní vlivy, na které se zaměříme v následující podkapitole.

4.2 Vlivy na produkci SCFA

4.2.1 pH

pH ve střevech hraje významnou roli v konkurování mezi různými bakteriálními druhy. V posledních studiích se ukázalo, že mírně kyselé pH omezuje růst *Bacteroides spp.* a podporuje růst *Firmicutes* a *Actinobacteria*. Je to z toho důvodu, že tlusté střevo je při pH 5,5 schopné spíše tolerovat přítomnost mastných kyselin, tvořených rodem *Firmicutes*. Díky této selektivě můžeme ve střevě s pH 5,5 sledovat změněné složení

bakterií, které má za následek omezenou tvorbu propionátu a zvýšenou produkci butyrátu. [7]

4.2.2 Střevní plyny

S největší pravděpodobností má koncentrace kyslíku v různých oblastech střeva vliv na množství SCFA. Některé bakterie spotřebovávají vodík a tím ovlivňují jeho parciální tlak ve střevě, tento proces ovlivňuje celkovou rovnováhu vytvořených fermentačních produktů, a tudíž i tvorbu SCFA. [7]

4.2.3 Železo

Nové studie ukazují, že při nedostatku železa v potravě může dojít k rapidnímu snížení produkce butyrátu i propionátu. Bakterie spřízněné s druhem *Roseburia* neprodukuje větší množství butyrátu při vyšších koncentracích železa. V kulturách *R. intestinalis* byla produkce butyrátu při vysokých koncentracích železa zvýšená, ale při nedostatku železa bakterie přešly na tvorbu laktátu. [7]

4.3. Cross-talk

Střevo bylo dříve považováno za „motor“ při mnohočetném orgánovém selhání. [52] Další studie prokázaly, jakým způsobem střevo ovlivňuje vznik a šíření onemocnění:

- Septický šok indukuje střevní hypoperfuzi, která vede ke reperfuzi střeva. Ta vede k produkci prozánětlivých mediátorů, které zesilují produkci prozánětlivých mediátorů, které zesilují systémovou zánětlivou odpověď organismu (SIRS – systemic inflammatory response syndrome). [53]
- Hypotéza střevní lymfy – pokud nebezpečné látky, pocházející ze střeva vstoupí do mezenterické lymfy a způsobí poškození plic. [54]
- Po sepsi ve střevě nacházíme zvýšenou apoptózu epitelu. [55]
- Interakce mezi bakteriálními patogeny a hostitelem vede ke střevní sepsi. [56]

Na střevo je třeba nahlížet jako na souznění 3 systémů – střevní epitel, imunitní systém a komenzální bakterie. Všechny tyto systémy komunikují a interagují pomocí tzv. cross-talku.

4.2.1 Interakce mezi střevním epitelem a imunitním systémem

Buňky epitelu slouží jako imunoefektorové buňky. Vylučují cytokiny, aby usnadnily prezentaci antigenu buňkám imunitního systému. Enterocyty (buňky epitelu tenkého střeva) působí jako buňky prezentující antigen a regulují odpovědi lymfocytů ve střevě. Zároveň také komunikují s intraepiteliálními T-buňkami a T-buňkami v *lamina propria*. [57,58]

4.2.2 Interakce mezi střevním epitelem a komenzálními bakteriemi

Komenzální bakterie jsou střevním epitelem vnímány pomocí PPR (Pathogen Pattern Receptor), ke kterým patří i TLR (toll-like receptory). Tyto receptory rozpoznají MAMP na bakteriích, popřípadě virech, a aktivují imunitní odpověď. U komenzálních bakterií obvykle nehrozí, že by způsobily onemocnění zdravého hostitele. Měly by udržovat integritu střevního epitelu. Pokud dojde k poškození epitelu, začnou bakterie pronikat mimo místo určení a mohou způsobit systémový zánět. [59,60] Komenzální bakterie jsou schopny produkovat zvýšené množství mucinu, který inhibuje adhezenci patogenních bakterií. [61] Také jsou schopny vyvolat produkci silného baktericidního proteinu (angiogenin 4) z Panethových buněk, který se zaměřuje na grampozitivní bakterie. [62] Komenzální bakterie mohou zeslabit transkripci zánětlivých cytokinů, které jsou produkovány epitelem, interferencí s transkripčním faktorem NFκB (Nuclear Factor Kappa B). [63]

4.2.3 Interakce mezi imunitním systémem a komenzálními bakteriemi

Pro normální vývoj slizniční imunity jsou nutné komenzální bakterie. Dendritické buňky (DC) sbírají ze střevního lumen antigeny a bakterie. Slizniční DC jsou ve větším počtu v distální oblasti tenkého střeva, což je i místo se zvětšeným počtem bakterií. Tento fakt naznačuje, že nejenom epitel, ale i bakterie jsou nezbytné pro správné fungování DC. DC přenášejí bakterie do mezenterických lymfatických uzlin, kde indukují

sekreci IgA. [64] Tohoto procesu se nezúčastňují T-buňky, takže je zabráněno imunitní reakci. Komenzálové taktéž nepronikají až za mezenterické lymfatické uzliny, takže jakákoliv imunitní odpověď je pouze na slizniční úrovni. [65] Podrobnější informace o imunitním systému budou uvedeny v následující kapitole.

5 IMUNITNÍ SYSTÉM

Všude kolem nás se nachází organismy, které námi mohou být vdechnuty, spolknuty nebo mohou kolonizovat naši kůži. Některé tyto mikroorganismy mohou být potencionálními patogeny. To, jestli se mikroorganismus pro nás stane patogenem schopným indukovat infekční onemocnění, závisí na jeho faktorech virulence a schopnosti našeho imunitního systému si vytvořit obranné mechanismy. [12]

Imunitní systém (IS) nám zajišťuje specifické, rychlé a především ochranné reakce proti cizím patogenům. IS je tvořen několika složkami, které spolu musí neustále interagovat a předávat si potřebné informace a signály. Do této skupiny můžeme zařadit primární a sekundární lymfoidní orgány, různé buňky a humorální složky. Jakákoliv porucha v těchto složkách může způsobit těžké infekce, alergie či autoimunitní onemocnění. [12]

V průběhu evoluce se náš IS měnil a zlepšoval. Proto dnes můžeme rozlišit vícero způsobů, jak naše imunita bude reagovat na cizorodou látku. Jedná se především o změnu v rychlosti a specifitě reakce. Ačkoliv se jedná o rozdílné mechanismy, v praxi mezi nimi existuje velká interakce vedoucí k účinné eliminaci patogena. [13]

5.1 Přirozená imunita

Přirozená imunita někdy také označována jako vrozená či nespecifická imunita. Jedná se o evolučně starší způsob obrany organismu proti patogenům. Mechanismy přirozené imunity jsou založeny na buněčných a humorálních složkách, které jsou v organismu připraveny předem bez předešlé znalosti rysů patogenů, tudíž nejsou ovlivněny předchozím setkáním s infekčním agens. Kromě imunitních mechanismů sem patří chemické, fyzikální a mikrobiální bariéry, které nám mohou poskytnout okamžitou ochranu (hovoříme o minutách). Do přirozené imunity patří např. fagocyty, NK (natural killers) buňky, neutrofilů, složky komplementu, nebo proteiny akutní fáze. [12, 13]

5.2 Specifické (adaptivní) mechanismy

Tyto adaptivní mechanismy, které jsou evolučně mladší, můžeme sledovat až u obratlovců. V tomto případě je imunitní odpověď založena na antigenně specifickém mechanismu. Jedná se o reakci protilátek (vysoce specifických molekul), které se aktivují až po setkání s antigenem (patogenem). Těmito reakcemi si imunitní systém buduje tzv. imunologickou paměť, kterou může v budoucnu použít na jednoznačnou a rychlou reakci. Důležitou roli představují T-lymfocyty a B-lymfocyty, které tvoří buněčnou složku specifické imunity. Velkou výhodou tohoto mechanismu je jeho specifita, k jejímuž rozvinutí potřebujeme několik dní až týdnů. [12,13]

5.3 Dendritické buňky

Dendritické buňky (DC) můžeme definovat jako hlavní regulátory imunitní odezvy. DC jsou zodpovědné za zahájení všech antigen-specifických imunitních reakcí. DC jsou hlavní buňky předkládající antigen (APC) a představují spojku mezi přirozenou – antigenně nescifickou imunitu s rychlým nástupem a adaptivní – antigenně specifickou s pomalým nástupem. DC mají schopnost imunitní systém nasměřovat na cizí antigeny, a tím zabraňují vzniku autoimunitních reakcí. Jsou tak důležité při vzniku rakoviny. [74]

V organismu můžeme dendritické buňky najít ve dvou stádiích – zralé/nezralé. Nezralé formy nacházíme na hranicích organismu a okolního prostředí, především ve sliznicích trávicího a dýchacího traktu. Na těchto sliznicích svými výběžky sbírají přítomné antigeny. DC jsou schopny cestovat mezi lymfou a krví. Nezralé DC pohlcují odumřelé buňky tkání, které následně zpracují a jejich fragmenty vystaví na svém povrchu společně v komplexu s MHC proteiny. Pokud se v organismu objeví podnět, který představuje nebezpečí, nezralé DC se aktivují a stávají se z nich zralé DC. Z nezralé formy do zralého stádia se dendritická buňka dostane za zhruba 48 hodin a tento proces je ireverzibilní. Zralé DC se přesunují ze sliznic a tkání do lymfatických uzlin, mění se na APC a ztrácí schopnost pohltit antigen. Úkolem zralých forem je aktivovat T-lymfocyty. Poté dendritické buňky zahynou apoptózou. [74]

5.4 Alergie

Alergii můžeme označit jako jedno z nejběžnějších onemocnění. Můžeme ji jednoduše definovat jako „přehnanou“ reakci IS na relativně neškodné všudypřítomné antigeny vnějšího prostředí – alergeny. Setkání s alergenem nesprávně vyvolá imunitní reakci, která vede ke tvorbě specifických protilátek isotypu IgE proti danému alergenu a Th2 cytokinů. Klinické projevy alergie (alergické reakce) mohou být různé od alergické rýmy či vyrážky až po anafylaktický šok a smrt. [14]

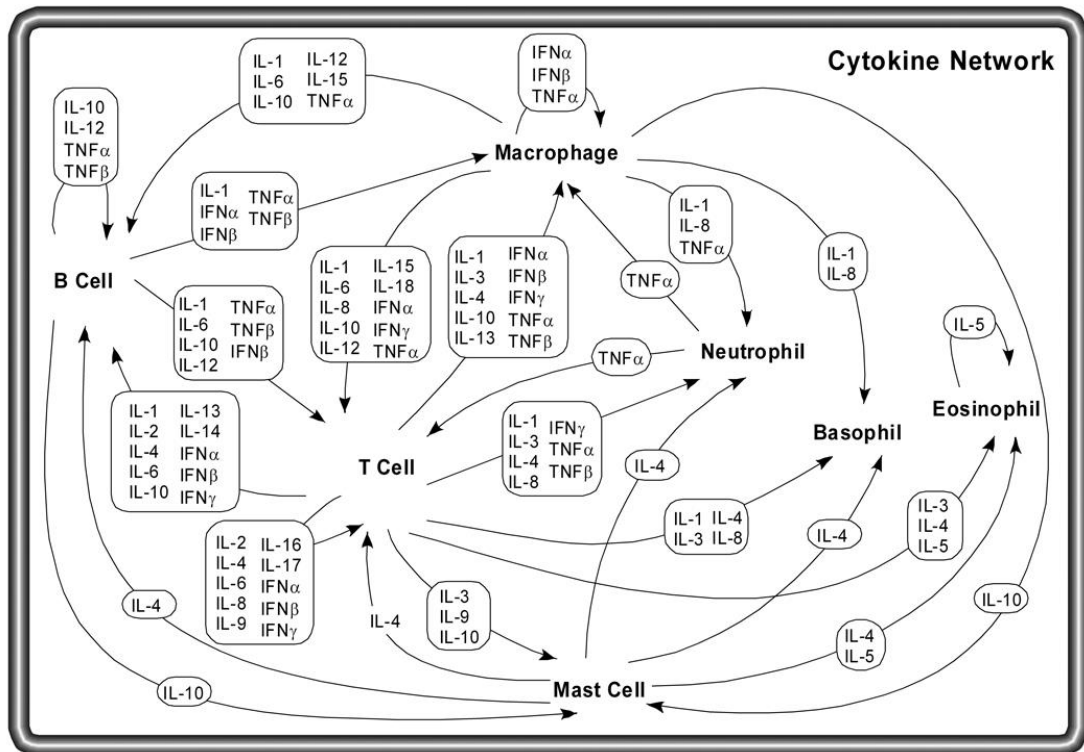
Pro vznik alergické reakce je důležitá senzitivace, která je ovlivněna více faktory, a to prostředím, genetickou predispozicí daného jedince vystaveného alergenu a povahou samotného alergenu. Z faktorů vnějšího prostředí má na vznik alergie vliv samotná expozice alergenu, absence kojení či užívání antibiotik v raném stádiu života. Znečištěné prostředí může oslabit mechanickou bariéru epitelové vrstvy, čímž se pro antigen stáváme prostupnější. U osoby vystavené antigenu hrají úlohu genetické predispozice. Alergen musí mít schopnost vyvolat imunitní reakci a vznik paměťových buněk, které se budou uplatňovat při dalším setkání s alergenem. [15]

5.5 Cytokiny

Cytokiny jsou efektorové signální molekuly, které se zapojují do fyziologických procesů. Své uplatnění nachází především jako regulátory imunitních a zánětlivých reakcí. Při nadbytečné nebo nedostatečné produkci cytokinů může docházet k řadě onemocnění. [16]

Cytokiny jsou pleiotropní, což znamená, že jeden cytokin může působit na různé druhy buněk nebo že různé druhy buněk mohou produkovat stejný cytokin. Často jsou ve svých aktivitách nadbytečné, tudíž podobné funkce mohou být mediovány různými cytokiny. Působí v takzvaných kaskádách – jeden cytokin stimuluje buňky ke tvorbě dalších cytokinů. Ve svých aktivitách mohou působit antagonisticky nebo synergicky, viz obrázek 2. [16,17]

Cytokiny mohou působit na buňky, kterými jsou produkovány – autokrinní účinek, mohou působit na sousední buňky – parakrinní účinek nebo mohou být krevním řečištěm přeneseny na vzdálená místa a ovlivňovat vzdálené buňky, v tomto případě se jedná o endokrinní účinek. [13,17]



Obrázek 2: Cytokinová síť. V imunitním systému hrají svou roli různé typy buněk, mluvíme o T-lymfocytech (T Cell), B-lymfocytech (B Cell), žírných buňkách (Mast Cell), neutrofilech (Neutrophil), bazofilech (Basophil), makrofágích (Macrophage) a eozinofilech (Eosinophil). Každá z těchto buněk má v imunitním systému rozlišnou roli, a proto si musí informace předávat pomocí cytokinů. Makrofágy označujeme jako buňky prezentující antigen a zastávají důležitou roli při fagocytóze. Své cytokiny využívají ke stimulaci B a T-lymfocytů a nespecifickým reakcím ostatních buněk. T-lymfocyty koordinují pomocné T buňky a B-lymfocyty při reakci specifické na antigen. Aktivace a proliferace eozinofilů, neutrofilů a bazofilů je taktéž ovlivněna cytokiny. [17]

5.5.1 Klasifikace cytokinů

Do skupiny cytokinů patří lymfokiny, což jsou cytokiny tvořené lymfocyty, monokiny – cytokiny tvořené monocyty, chemokiny – cytokiny s chemotaktickými aktivitami a interleukiny, což jsou cytokiny vytvořené jedním leukocytem působící na jiné leukocyty. Interleukiny jsou skupina cytokinů, které regulují vývoj a aktivaci leukocytů.

[13,17] V následujících odstavcích budou uvedené informace o interleukinech studovaných v praktické části této bakalářské práce.

5.5.2 Interleukin 1 (IL-1)

IL-1 je polypeptid, který je primárně produkován po infekci nebo poranění. IL-1 indukuje remodelaci tkáně, a to tak že přispívá k destruktivním, nebo opravným procesům. Při proniknutí IL-1 do krevního oběhu se začne chovat jako hormon a způsobovat širokou škálu systémových změn. IL-1 hraje významnou roli při aktivaci imunitní odpovědi, aktivuje lymfocyty a stimuluje produkci metabolitů arachidonové kyseliny. IL-1 může působit synergicky s ostatními cytokiny. [72]

5.5.3 Interleukin 2 (IL-2)

IL-2 je glykoprotein, který je produkován pro zesílení imunitních reakcí T pomocnými buňkami. Prokázalo se u něj mnoho imunostimulačních a imunomodulačních vlastností. IL-2 je schopný aktivovat cytotoxickou funkci NK buněk (Natural Killers), stimuluje proliferaci T-buněk a podporuje cytotoxicitu efektorových buněk proti různým novotvarům. Dnes se IL-2 používá jako lék k léčbě metastatického melanomu, protože byl dokázán jeho vliv na regresi onemocnění. [68]

5.5.4 Interleukin 4 (IL-4)

IL-4 je pleiotropní cytokin, která je produkován T-buňkami, mastocyty, bazofily a eozinofily. V organismu má IL-4 mnoho významných funkcí mezi které patří stimulace B-buněk na plazmatické buňky a proliferace aktivovaných B a T buněk. Nadprodukce tohoto interleukinu je spojována s alergiemi. IL-4 inhibuje aktivaci makrofágů do M1 buněk a podporuje je v alternativní aktivaci do M2 buněk, čímž zastává roli při zánětu nebo hojení ran. Ve svých účincích je velmi podobný jako IL-13. [69]

5.5.5 Interleukin 10 (IL-10)

IL-10 je známý hlavně pro své imunosupresivní a protizánětlivé účinky. Je produkován různými imunitními buňkami, které se účastní vrozené i adaptivní imunity.

Primární funkcí IL-10 je zmírnit imunitní odpověď hostitele na mikroby, čímž zabraňuje poškození tkáně. IL-10 inhibuje nadměrnou aktivaci a proliferaci T-buněk a expresi prozánětlivých cytokinů. [70]

5.5.6 Interleukin 13 (IL-13)

IL-13 je kodován imunoregulačním cytokinem, který je produkován převážně Th2 buňkami. IL-13 se podílí na některých fázích zrání B-buněk a jejich následné diferenciaci. Jednou z mála funkcí tohoto cytokinu je zvyšovat expresi CD23 a MHC třídy II a pomáhá k přenastavení izotypů IgE B lymfocytů. Tento cytokin dokáže inhibovat produkci prozánětlivých cytokinů a chemokinů, tím že stíží aktivitu makrofágů. Působí prostřednictvím mechanismů nezávislých na IgE a eosinofilech. [76]

5.5.7 Interleukin 17 (IL-17)

IL-17 je vylučován aktivovanými T-lymfocyty. Jedná se o protizánětlivý cytokin, který je schopný ovlivňovat expresi mediátorů zánětu, nejvíce těch, kteří mají vliv na zrání, chemotaxi a proliferaci neutrofilů. Zvýšené hladiny IL-17 mohou znamenat zánět dýchacích cest, zánětlivé onemocnění střev, revmatoidní artritidu, psoriázu, rakovinu nebo roztroušenou sklerózu. [71]

5.5.8 Interferon gama (IFNg)

Interferon gama hraje společně s IL-4 důležitou roli při regulaci imunitních odpovědí. Ve svých funkcích jsou vůči sobě jako antagonisté. IFNg inhibuje diferenciaci Th2 buněk a stabilizuje Th1 buňky, zatímco IL-4 má funkce přesně opačné. IL-4 a IFNg společně ovlivňují expresi Fc receptorů, což má dopad na efektorové mechanismy, které mají na starosti produkci protilátek. IFNg a IL-4 jsou antagonisté i v ovlivňování aktivity makrofágů, přičemž jeden jejich aktivitu indukuje a zesiluje, druhý činí přesný opak. [75]

Všechny tyto interferony mohou být stimulovány probiotiky. O problematice probiotik bude pojednávat další kapitola.

5. PROBIOTIKA

Probiotika jsou živé nepatogenní mikroorganismy, které jsou podávány pro zlepšení mikrobiální rovnováhy, a to zejména v GIT. Do této skupiny organismů patří kvasinky kmene *Saccharomyces boulardii* a bakterie mléčného kvašení, konkrétně druhy *Lactobacillus* spp. a *Bifidobacterium* spp.. [20]

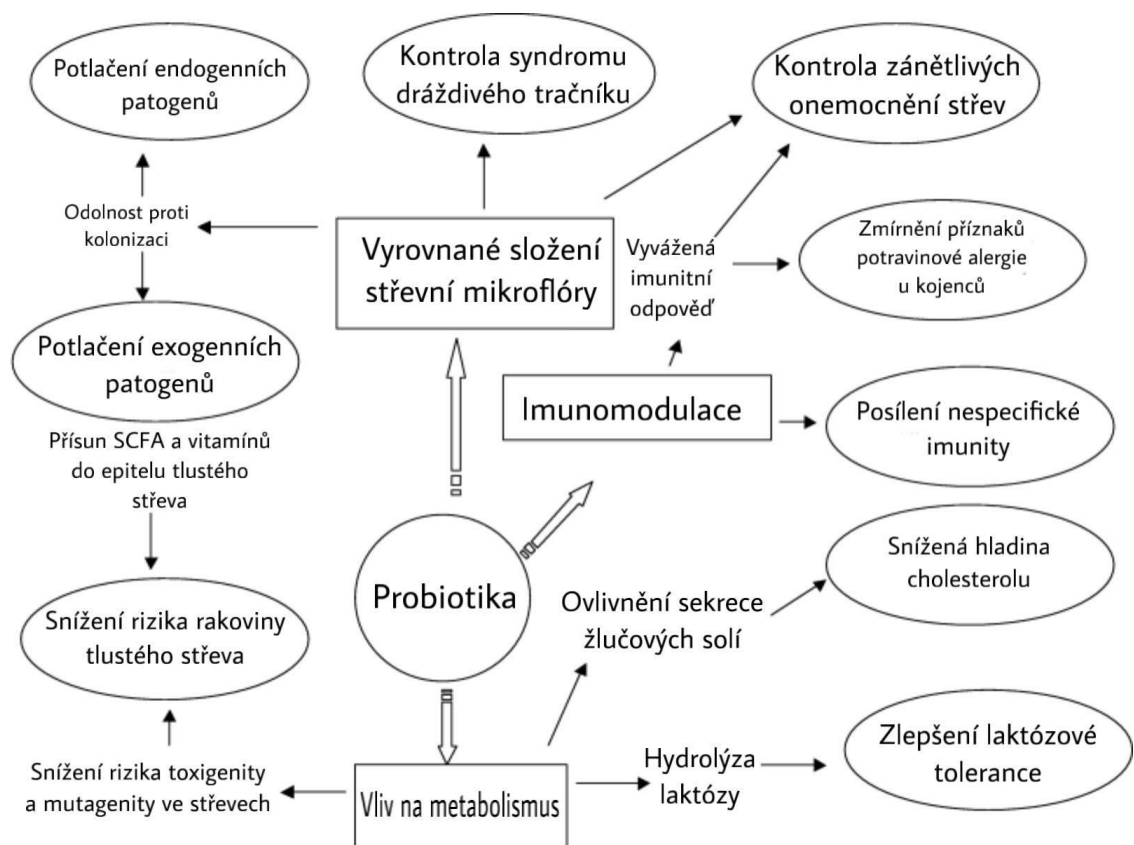
5.6 Historie

Koncept probiotik se objevil před více než sto lety, a to díky držiteli Nobelovy ceny Iljou Mečnikovem, který izoloval první probiotikum *Lactobacillus bulgaricus*. Později v roce 1965 byl zaveden termín „probiotikum“ Lilly a Stillwellem, který popisoval růstové faktory produkované jedním organismem stimulující vývin druhého. [18] O pár let později v roce 1974 byly považovány za organismy, které s jejich metabolity přispívají ke střevní rovnováze. [40] Po mnoha dalších pokusech o zdokonalení definice se nakonec v roce 2001 FAO a WHO dohodli, že definují probiotika jako živé mikroorganismy, které podané v adekvátním množství mají příznivý dopad na hostitele. [19]

5.7 Působení probiotik

Probiotika mají v našem těle spoustu úkolů. Konečným metabolickým produktem bakterií jsou kyselina mléčná a octová, což jsou organické kyseliny, které snižují pH ve střevech. [21] Udržují rovnováhu mezi GIT a imunitním systémem. Slizniční povrch střeva slouží jako hranice, která rozděluje prostředí na „vnější“ a „vnitřní“. Na tomto rozhraní nacházíme mikroby a cizí antigeny, které interagují se složkami imunitního systému. [21] Zlepšují imunitní funkci sliznice, ovlivňují sekreci hlenu a slouží jako prevence proti potencionálnímu onemocnění. [23] Mikroby ve střevech posilují bariérovou funkci střevní sliznice, a tím snižují možnost průchodu antigenů nebo patogenních bakterií do krevního řečiště. [22] Mohou být využity k likvidaci patogenů a jako doplněk antibiotik. [25]

Ukázalo se, že bakterie kmene *Lactobacillus* mají vliv na zlepšení trávení laktózy, snižují průjem u intolerantních jedinců i u jedinců se syndromem krátkého střeva a snižují hladinu cholesterolu v krvi. [24, 26] Druh *Lactobacillus plantarum* dokáže snížit nadýmání a bolest u syndromu dráždivého tračníku [27] a taktéž má pozitivní vliv na imunitu HIV pozitivních dětí. [28] Působení probiotik je shrnuto v obrázku 3.



Obrázek 3: Působení probiotik, převzato a upraveno z [27]

5.8 Probiotika a imunitní systém

Jak už bylo zmíněno výše, probiotika mohou mít imunomodulační účinek. Ovlivňují náš imunitní systém, tím že interagují DC, buňkami epitelu a zároveň s monocyty a lymfocyty. Specifický imunitní systém závisí na B a T lymfocytech, které jsou specifické pro konkrétní antigeny. Vrozený imunitní systém reaguje na molekulární struktury typické pro povrch patogenních organismů - MAMP (Microbe-Associated Molecular Patterns). MAMP jsou vázány na PPR (Pattern Recognition Receptor), což jsou

receptory rozeznávající typy struktury, a tím se spouští primární odpověď. Nejznámějšími PPR jsou toll-like receptory (TLR). Střevní epitelové buňky (IEC - intestinal epithelial cell) jsou schopny s probiotiky interagovat nejvíce. IEC a DC mohou interagovat se střevní mikrobiotou pomocí PPR. [41,42]

K tomu, abychom mohli použít bakterii jako probiotikum, musí splňovat následující požadavky:

- Musí mít příznivý dopad na hostitele
- v potravě se vyskytovat ve vysokém počtu a zachovat si životaschopnost po celou dobu
- přežít průchod GIT, odolat nízkému pH a kyselinám
- mít schopnost přichytit se na buňky střevního epitelu a kolonizovat lumen traktu
- secernovat antimikrobiální látky proti patogenům
- stabilizovat střevní mikrobiotu
- nesmí být patogenní ani toxické [21]

5.9 Prebiotika

K probiotikům neodlučitelně patří i prebiotika. Prebiotika jsou nestravitelné oligosacharidy, které jsou hlavním zdrojem potravy pro střevní mikroorganismy. Díky jejich fermentaci dochází k okyselení obsahu tlustého střeva. Taktéž produkují mastné kyseliny s krátkým řetězcem, které mají vliv na regulaci buněčných procesů. Podporují růst endogenních bakterií jako jsou bifidobakterie a laktobacily, které jsou pro naše tělo prospěšné. [29] Symbiotikum je synergicky působící kombinace probiotik a prebiotik. [73]

5.10 Druhy probiotik

Mezi nejznámější probiotika patří bakterie mléčného kvašení (BMK) - *Lactobacillus Bifidobacterium*. Spolu s dalšími probiotickými druhy jsou zaznamenány v tabulce 1.

Tabulka 1: Organismy používané jako probiotika – upraveno podle [43]

Druh <i>Lactobacillus</i>	Druhy <i>Bifidobacterium</i>	Další bakterie mléčného kvašení	Nemléčné bakterie
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>toyoi</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i> kmen nissle
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	
<i>L. gallinarum</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
<i>L. gasseri</i>			
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

5.11 Probiotické druhy *E. coli* a jejich přípravky

Probiotické *E. coli* se dnes komerčně prodávají ve 3 přípravcích: Mutaflor, Symbioflor 2 a Colinfant Newborn. Jejich vlastnosti jsou zahrnuty v tabulce 2.

Tabulka 2: Produkty z probiotické *E. coli*, převzato a upraveno [45]

Produkt	Mutaflor	Symbioflor 2	Colinfant Newborn
Forma podání	kapsle	kapky	prášek pro perorální suspenzi
Doporučená dávka	1-2 kapsle/den	2-4 ml	0,8-1,6x10 ⁸ CFU 3x/týden
Obsah jedné dávky	2,5-25x10 ⁹ CFU/kapsle	1,5-4,5x10 ⁷ CFU/ml	0,8-1,6x10 ⁸ CFU/dávka
Sérotyp	O6:K5:H1	Variabilní, zahrnuje O:35,129,O169; Všechny H-	O:83:K24:H31
Plazmidy	2 plazmidy	12 plazmidů	Žádné plazmidy
Bakteriociny	Mikrocin M, H47	Mikrocin S	-
Motilita (pohyblivost)	Ano - přítomna flagella	Ne	-
Množství genů	5324 genů	28 180 genů	-

CFU – Colony Forming Units (jednotky tvořící kolonie)

5.11.1 Mutaflor

V roce 1917 prof. Alfred Nissle objevil nový kmen *Escherichia coli*, která inhibovala růst jiných mikrobů a sama neměla žádné patogenní účinky. [44] Izolovaná *E. coli* Nissle 1917 jako jedna z mála probiotik nepatří mezi bakterie mléčného kvačení. [45] Později byla serologicky typizována jako O6:K5:H1. Dnes se v klinické praxi používá jako probiotikum pod komerčním názvem Mutaflor vyráběný firmou Ardeypharm GmbH v Německu. [44]

Kolonizace střev touto probiotickou bakterií má příznivý vliv na imunitní systém, tím, že stimuluje specifickou buněčnou i humorální odpověď a současně i nespecifickou imunitu. Zároveň se zvyšuje koncentrace specifických protilátek ve střevech, slinách i séru. Své využití našla především při prevenci enterokolitidy u novorozenců

a nedonošených dětí. [44] Přípravek Mutaflor se dnes používá na léčbu zánětlivých chorob střev, infekčních průjmů funkční střevní dyspepsii nebo při problémech při podávání antibiotik. Svoje uplatnění našel i při léčbě Crohnovy choroby a pouchitidy. [45]

5.11.2 Symbioflor 2

Symbioflor byl poprvé zpřístupněn v Německu, když ho začala poskytovat firma Symbiopharm GmbH. Obsahuje šest genotypově podobných *E. coli* kmeny označené: G1/2, G3/10, G4/9, G5, G6/7 a G8. [46] Přípravek je určen k léčbě syndromu dráždivého tračníku (IBS) u dětí i dospělých. [47]

Předmětem zkoumání je schopnost Symbiofloru léčit nádory. Symbioflor totiž vykazuje schopnost zacílit nádor. Může tedy představovat ideální bakteriální bio-vehikulum pro dodávání terapeutických molekul cílených na nádor. [48]

5.11.3 Colinfant Newborn

Colinfant Newborn (CNB) je přípravek vyráběný firmou Dyntec v České Republice. CNB obsahuje pouze jeden kmen *E. coli* AO 34/86 (O83:K24:H31). [45] Tento přípravek byl používán v pediatrických odděleních k profylaktické a terapeutické kolonizaci střeva u předčasně narozených dětí a novorozenců. Kolonizace střev *E. coli* O83:K24:H31 ihned po narození efektivně snížila opakované infekce a rozvoj alergií v pozdějším věku. [50,51] Podání tohoto probiotika podporuje zrání dendritických buněk (DC) a změnu imunitní odpovědi. Nacházíme i zvýšenou genovou expresi a sekreci //10 v DC. [11]

6 METODIKA

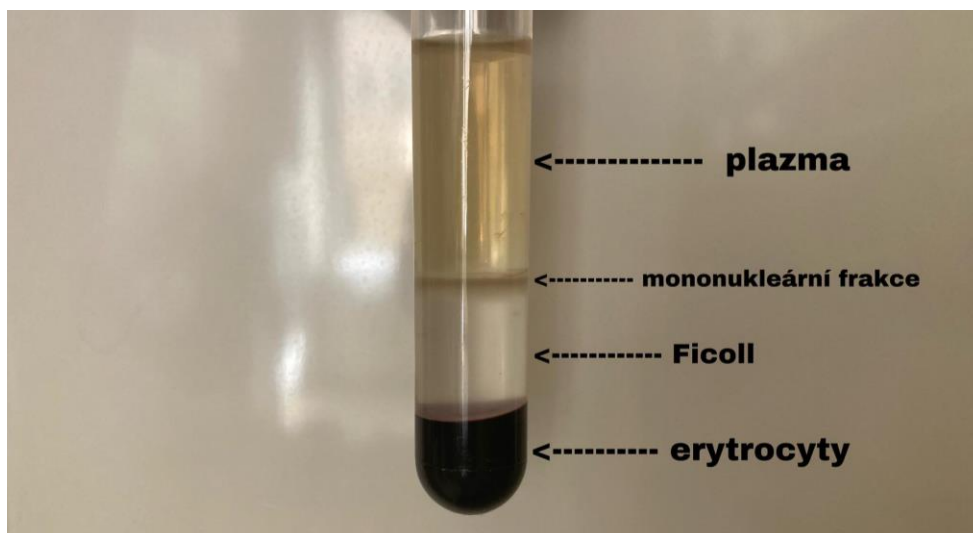
Praktická část je zaměřena na stanovení imunomodulačních vlastností *E. coli* O83:K24:H31 přítomné v probiotické vakcíně. Rozdílné koncentrace metabolitů budou přidávány k izolovaným frakcím mononukleárních leukocytů získaných z buffy coatu periferní krve. Bude sledován vliv metabolitů na změnu genové exprese, kterou budeme kvantifikovat pomocí RT-PCR (polymerázová řetězová reakce v reálném čase).

Pro tento experiment byly použity buňky PBMC, které jsou snadno dostupné a exprimují toll-like receptor TLR2 a TLR 4, stejně jako CD14, u kterých bylo prokázáno, že zprostředkovávají imunitní odpověď na mikrobiální složky jako je například peptidoglykan.

6.1 Izolace buněk z buffy coatu

Krev z buffy coatu je třeba naředit v poměru 1:1. V našem případě jsme ředili 25 ml krve s 25 ml PBS (fosfátový pufr). Do šesti zkumavek jsme Pasteurovou pipetou napipetovali 3 ml Ficollu (Ficoll-Paque™ PLUS, GE Healthcare, USA) a na něj opatrně vrstvlili 5 ml naředěné krve. To vše jsme dali do centrifugy na 30 minut, 300G, na 21 ° C a nastavili jsme režim bez brždění.

Po stočení se nám krev rozdělila na 4 frakce – plazma, mononukleární buňky, ficoll a erytrocyty. Viz obrázek 4. Plazmu ze všech zkumavek jsme odstranili, dvě vzniklé mononukleární frakce jsme přenesli do nové zkumavky (nyní nám z 6 zkumavek vznikly 3 nové zkumavky) a přidali k nim zhruba 2 ml PBS. Vzniklé frakce ficollu a erytrocytů nejsou pro naši práci důležité a můžeme je vyhodit. 3 nové zkumavky s mononukleárními frakcemi a PBS dáme opět stočit do centrifugy, která bude tentokrát nastavena na 500G na 10 minut při 20 °C.



Obrázek 4: Rozdělení frakcí pomocí Ficollu

Nyní přichází fáze promývání, kdy odstraníme supernatant, rozklepeme vzniklou peletku, opět slejeme dvě zkumavky dohromady a přidáme 2 ml PBS. Promícháme a centrifugujeme tentokrát na 500G na 10 minut při 20 ° C. Opět odstraníme supernatant, rozklepeme buňky usazené na dně, slejeme dvě zkumavky dohromady a přidáme 2 ml PBS. V tomto okamžiku máme pouze jednu zkumavku, kterou dáme stočit na 500G na 10 minut při 20 ° C. Po stočení slejeme supernatant.

Z takto promytých buněk si dáme bokem 3 μ l, ze kterých budeme stanovovat viabilitu. Ke zbytku promytých buněk přidáme 2 ml kultivačního média RPMI (RPMI-1640 Medium, Sigma-Aldrich s.r.o., USA) a řádně promícháme. Příprava kultivačního média je uvedena v tabulce 3.

Tabulka 3: Příprava kultivačního média

Složka	Množství
RPMI	134 ml
FBS	15 ml
Gentamycin	150 μ l
Hepes	300 μ l

RPMI (Roswell Park Memorial Institute) je růstové médium, využívané pro buněčné kultury.

FBS (Fetal Bovine Serum) – krev odebraná z plodu skotu, obsahuje hodně růstových faktorů.

Gentamycin – antibiotikum

Hepes – využíván jako pufrovací činidlo [<https://www.thermofisher.com>]

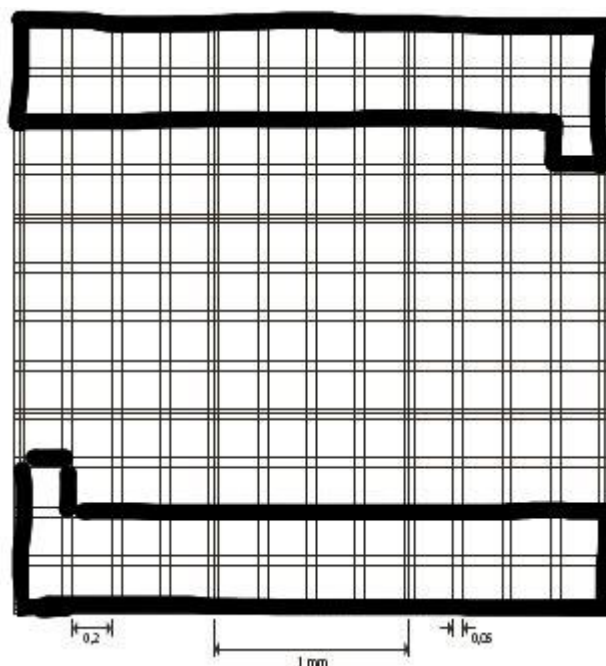
6.2 Stanovení viability a počtu buněk

6.2.1 Viabilita

Na podložní sklíčko dáme 3 μl izolovaných buněk, přidáme 3 μl tropanové modři (Trypan Blue 0,4%, LONZA BIOTEC s.r.o, ČR) promícháme a přikryjeme krycím sklíčkem. Buňky sledujeme pod mikroskopem a stanovujeme jejich životnost. Počítáme procentuální životnost na 100 buněk. Trypanová modř je z živých buněk aktivně transportována ven, tudíž modře zbarvené buňky jsou mrtvé. Trypanová modř patří mezi jedovaté látky.

6.2.2 Počet buněk

50 μl suspenze bb přidáme do 950 μl Turkova roztoku. Necháme 10 minut inkubovat a zlyzovat erythrocyty. Přeneseme 3 μl roztoku do Bürkerovy komůrky a spočítáme buňky. Počítáme 2 x 25 čtverců systémem L (Obr. 5).



Obrázek 5: Bürkerova komůrka. Vyznačené oblasti počítaných čtverců.
[převzato a upraveno z internetové stránky <https://www.thermofisher.com>]

6.3 Stimulace buněk v termostatu

Do každé jamičky bylo zapotřebí dát 2×10^6 buněk. K izolovaným buňkám byly přidávány v různých množstvích stimulatory. Celkový objem jamiček činil 2 ml, proto se ke směsi stimulatorů a buněk přidávalo do daného množství ředidlo - RPMI. Všechny poměry jsou uvedeny v tabulce 4.

V každém pokusu bylo v Burkerově komůrce napočítáno jiné množství buněk, proto bylo potřeba vypočítat množství přidané buněčné suspenze pro každý pokus zvlášť. V tabulce číslo tři je pro představu uvedeno množství buněčné suspenze z experimentu 1, kdy jsme v Burkerově komůrce napočítali 66×10^6 buněk v mililitru, což odpovídá 0,030 ml = 30 μ l.

Tabulka 4: Stimulace buněk

[μ l]	Stimulant	Buňky	RPMI
K	X	30	1970
LB	200	30	1770
EC	10	30	1960
LPS (1mg/ μ l)	2	30	1968
AE 200	200	30	1770
AE 40	40	30	1930
AE 8	8	30	1962
AE 1,6	1,6	30	1968,4
AN 200	200	30	1770
AN 40	40	30	1930
AN 8	8	30	1962
AN 1,6	1,6	30	1968,4

K – kontrola, LB – LB médium, EC – *Escherichia coli*, LPS -lipopolysacharid , AE – aerobní kultivace *E. coli*, AN – anaerobní kultivace *E. coli*

Stimulace probíhá po dobu 1 hodina a 4 hodiny. Po první stimulaci pod lupou zkontrolujeme, jestli jsou buňky v jamkách destičky. Do štítkem označených mikrozku mávek přeneseme 1 ml stimulovaných buněk. Ty budeme centrifugovat po dobu 10 minut na 500G. Odpipetujeme supernatant a k peletě přidáme další 1 ml

stimulovaných buněk. Opět centrifugujeme na 500G na 10 minut. Supernatant opět odpipetujeme pryč.

Jako další krok přidáme k vzniklým peletám 350 μ l lyzačního roztoku. Lyzační roztok je třeba si připravit, a to tak že smícháme RLT pufr (Buffer RLT, Quigen, Německo) s merkaptoethanolem (2-Mercaptoethanol, Sigma-Aldrich s.r.o., USA) podle tabulky 5. S merkaptoethanolem je třeba kvůli jeho vysoké toxicitě pracovat v laminárním boxu se spuštěnou digestoří.

Tabulka 5: Příprava lyzačního roztoku

Složka	Množství
RLT pufr	2500 μ l
merkaptoethanol	25 μ l

6.4 Izolace RNA

Zkumavky s buňkami a lyzačním roztokem dáme točit na 10:00 na 500G při 23 C. Přidáme 350 μ l 70% ethanolu a pečlivě promícháme pipetou. Mícháme opatrně, aby nevznikaly bubliny. Obsah zkumavky přeneseme do růžové zkumavky s kolonkou a točíme na 8000G. Proteklou kapalinu můžeme vylít. Do kolonky přidáme 350 μ l RW1 Bufferu a centrifugujeme na 8000G na 15s. Slejeme tekutinu ze spodního dílu. K dalšímu kroku byla použita DNÁza, která musela být namíchána – 10 μ l DNÁzy a 70 μ l RDD pufru (RNase-Free DNase Set, QIAGEN, USA). DNÁzu aktivujeme převrácením zkumavky, nevortexujeme. Musí být nanesena přímo na prostřední část kolonky. Necháme 15 minut inkubovat. Po 15 minutách opět přidáváme do kolonky 350 μ l pufru RW1, točíme na 8000G na 15 sekund. Opět vyléváme přebytečnou tekutinu. Do kolonky přidáváme 500 μ l pufru RPE, který točíme na 8000G po dobu 1 min. Sléváme přebytečnou tekutinu a řádně sušíme. Vyměníme spodní kolonky a pro úplné vysušení točíme ještě jednou na 8000G po dobu 1 min.

Posledním krokem je eluce RNA přichycené na kolonce. Vyměníme spodní díl za eppendorfku, na kolonku přidáme 30 μ l RNA free water a točíme na 8000G po 1 minutu. Z takto izolovaných buněk musíme nejlépe změřit čistotu a koncentraci RNA. Po změření koncentrace RNA se může dát zamrazit na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a nechat pro další využití. Na izolaci byl využit komerčně zakoupený kit RNeasy Mini Kit (250) od společnosti QIAGEN (USA).

6.4.1 Měření koncentrace RNA

Měření koncentrace RNA probíhalo na přístroji jménem NanoDrop One od firmy ThermoScientific (Obr.6). Po spuštění stroje musíme vybrat z nabídky požadavek, který chceme měřit (RNA, cDNA, DNA, ...). Zvedneme rameno a na senzor nanese kapičku vody (2 μ l), spustíme spektrofotometr a proměříme blank. Opět zvedneme rameno, otřeme kapku vody, na senzor dáme kapičku vzorku (zhruba 2 μ l) a opatrně zaklapneme rameno. Vyčkáme na konec měření, rameno zvedneme, otřeme senzor a můžeme měřit další vzorek. Výsledky z NanoDropu jsou uvedeny v tabulce 6. Na konci měření na senzor opět nanášíme kapičku vody pro opláchnutí.



Obrázek 6: Přístroj NanoDrop One

Tabulka 6: Výsledné koncentrace RNA

	1 hodina			4 hodiny		
ng/ul	EXP 1	EXP 3	EXP 4	EXP 1	EXP 3	EXP 4
K	32,816	38,43	63,26	39,632	33,72	61,85
LB	35,066	23,66	48,47	39,538	41,52	75,45
EC 10:1	33,104	38,44	43,80	18,402	39,71	57,09
LPS	38,673	57,25	38,50	23,664	38,83	70,94
AE 200	31,87	42,04	67,10	18,962	45,74	38,54
AE 40	33,906	43,58	81,75	24,975	53,87	60,21
AE 8	33,612	40,78	56,62	34,164	48,58	59,98
AE 1,6	26,574	25,70	53,91	44,22	61,72	72,75
AN 200	33,034	33,81	56,42	31,075	61,87	59,25
AN 40	57,731	50,20	89,64	20,248	58,22	64,45
AN 8	26,426	39,81	78,39	22,662	43,43	54,18
AN 1,6	27,548	22,04	79,00	23,78	38,16	42,39

6.5 Přepis RNA na cDNA

Do této reakce budeme přidávat izolovanou RNA, H₂O a premix. Do každé reakce musí přijít stejné množství izolované RNA – 5 ng, proto musíme z koncentrace RNA vypočítat, jaké množství bude potřeba dát do každé jamky v μ l. Premix namícháme podle tabulky 7 a do každé jamičky dáme stejné množství 2,9 μ l. Celkový obsah jamičky bude 10 μ l, proto zbytek chybějícího objemu doředíme H₂O. Pro přepis z RNA do cDNA byl využit kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit od firmy Applied Biosystems™ (USA).

Tabulka 7: Složení premixu

Složka	Množství
10 x RT buffer	1
25xDNTP mix	0,4
10x random primer	1
RT	0,5

Buffer - pufr, DNTP mix – deoxynukleosid-trifosfátový mix, random primer - oligodeoxyribonukleotidy, RT – reverzní transkripce

Přepis RNA do cDNA proběhne ve stroji PTC-200 Peltier Thermal Cycler od firmy BioRad. Cyklus byl nastaven podle tabulky 8.

Tabulka 8: Nastavená cyklů pro přepis RNA do cDNA

Krok	Teplota	Čas
1.	25 °C	10 min
2.	37 °C	120 min
3.	85 °C	5 min
4.	4 °C	10 min

10 μ l Přepsané cDNA jsme naředili 40 μ l H₂O na celkový objem 50 μ l.

6.6 RT-PCR

Součástí reakce bude přepsaná cDNA, MasterMix (Luna Universal Probe qPCR Master Mix, BioLabs, Anglie), RNA free voda a próba. Celkový objem mixu v reakci je 8 μ l a jeho složení je uvedeno v tabulce 9. K mixu se následně přidají 2 μ l přepsané cDNA, aby byl celkový objem 10 μ l. Použité próby jsou zaznamenány v tabulce 10.

Tabulka 9: Složení mixu

Složka	Množství [μ l]
MasterMix	5
Próba	0,5
H ₂ O	2,5

Tabulka 10: Použité próby

Próba	Číslo
IL-1	Hs00174097_m1
IL-2	Hs00174114_m1
IL-4	Hs00174122_m1
IL-10	Hs00174086_m1
IL-13	Hs00174379_m1
IL-17a	Hs00174383_m1
IFNg	Hs00174143_m1

PCR reakce proběhne ve stroje LightCycler 480 od firmy Roche. Cyklus, ve kterém bude reakce probíhat je uveden v tabulce 11.

Tabulka 11: Nastavení cyklů pro PCR reakci

Krok	Teplota	Čas
1.	50 °C	2 min
2.	95 °C	10 min
3.	40 x 95 °C	15 s
4.	60 °C	1 min

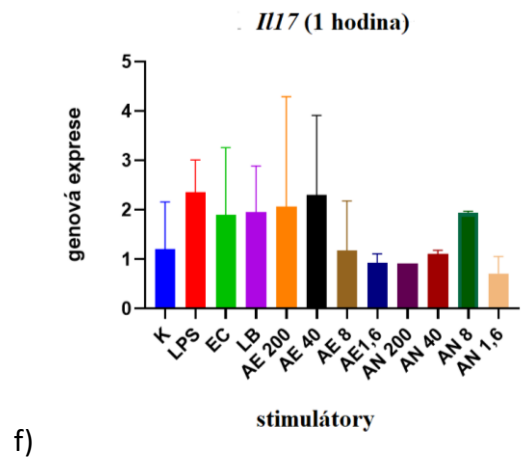
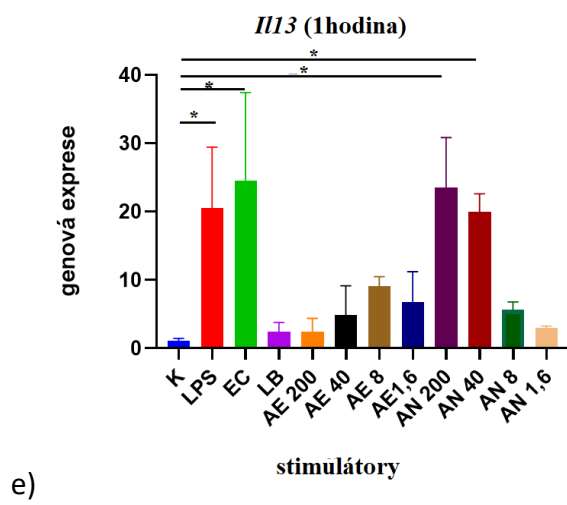
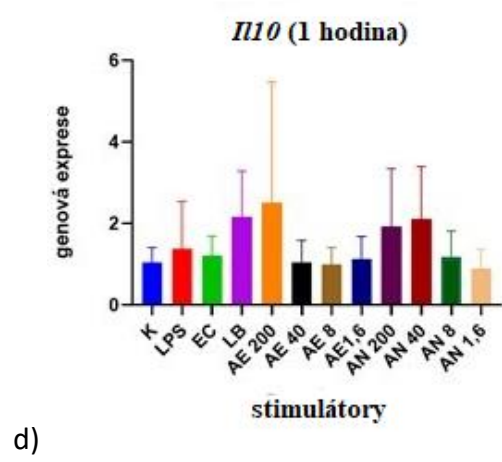
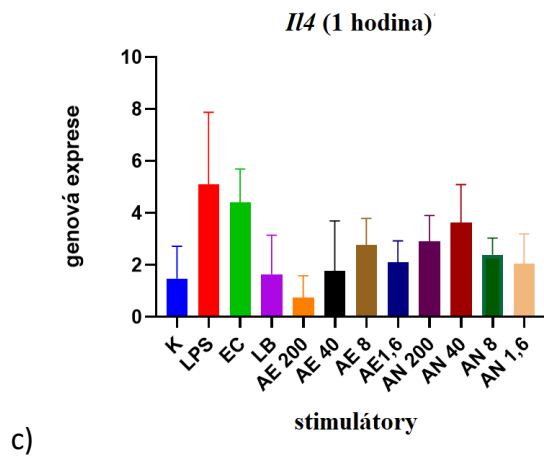
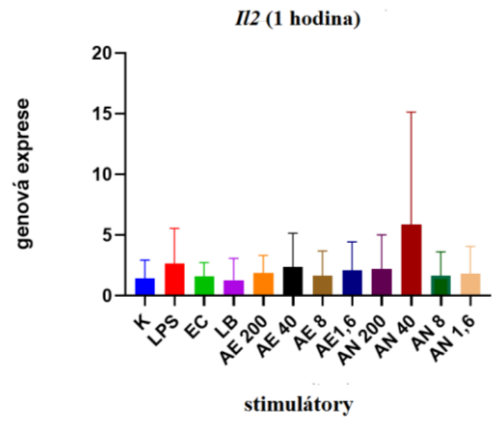
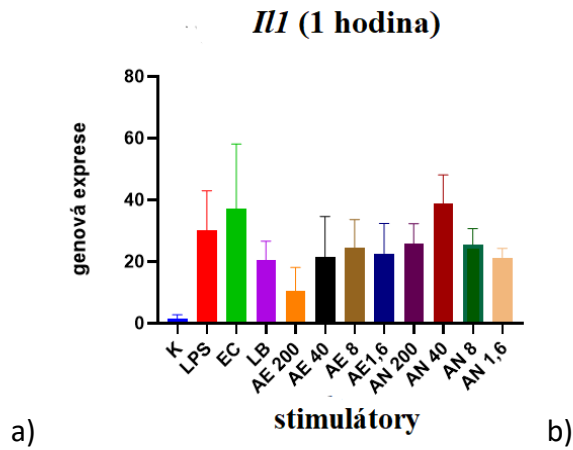
7 VÝSLEDKY

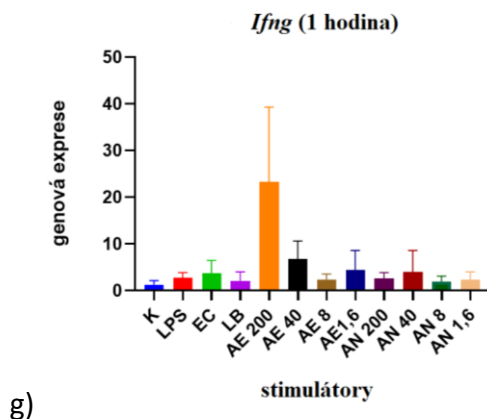
Pro porovnání genové exprese cytokinů po stimulaci mastnými kyselinami s krátkým řetězcem tvořených *E. coli* byla použita kvantitativní metoda RT-PCR. Genová exprese byla měřena po stimulaci PBMC různými koncentracemi metabolitů bakteriální kultury po jedné hodině a po čtyřech hodinách.

Pro znázornění výsledků byly použity sloupcové grafy, které byly vytvořeny pomocí softwaru GraphPad. Pro statistické vyhodnocení rozdílů byl zvolen t-test a level významnosti byl stanoven na $p = 0,05$. Jako negativní kontrola byla použita nestimulovaná kontrola a jako pozitivní kontrola byl zvolen LPS či samotná bakterie *E. coli*.

7.1 Vliv metabolitů na změnu genové exprese v PBMC po 1 hodině stimulace

Genová exprese *Il1* (Obrázek 8a) byla u všech stimulovaných PBMC na první pohled vyšší než u nestimulované kontroly, ovšem ze statistického hlediska se nejednalo o významnou změnu. Genová exprese *Il2* (obrázek 8b) stimulovaných PBMC nebyla vyšší než hodnota exprese u nestimulovaných buněk. Statisticky nevýznamná byla i genová exprese *Il4* (obrázek 8c). Hladina genové exprese *Il10* (obrázek 8d) nestimulované kontroly nebyla statisticky rozdílná od stimulovaných PBMC. U genové exprese *Il13* (obrázek 8e) byl naměřen statisticky významný rozdíl mezi nestimulovanou kontrolou a pozitivními kontrolami LPS, kdy $p = 0,0200$ a EC, kdy $p = 0,0340$. Zároveň byl naměřen statisticky signifikantní rozdíl mezi nestimulovanými PBMC a buňkami stimulovanými různými koncentracemi metabolitů z anaerobní kultivace *E. coli* a to konkrétně AN 200, kdy $p = 0,0063$ a AN 40, kdy $p = 0,003$. U genové exprese *Il17a* (obrázek 8f) nacházíme snížené hladiny exprese u AE 1,6, AN 200, AN 40 a AN 1,6 v porovnání s kontrolním nestimulovaným vzorkem, avšak nejedná se o žádný statisticky signifikantní rozdíl. Při statistickém vyhodnocení vlivu metabolitů na změnu genové exprese *Ifng* nebyl nalezen žádný signifikantní rozdíl mezi hladinami genové exprese nestimulované kontroly a hladinami genové exprese stimulovaných PBMC.





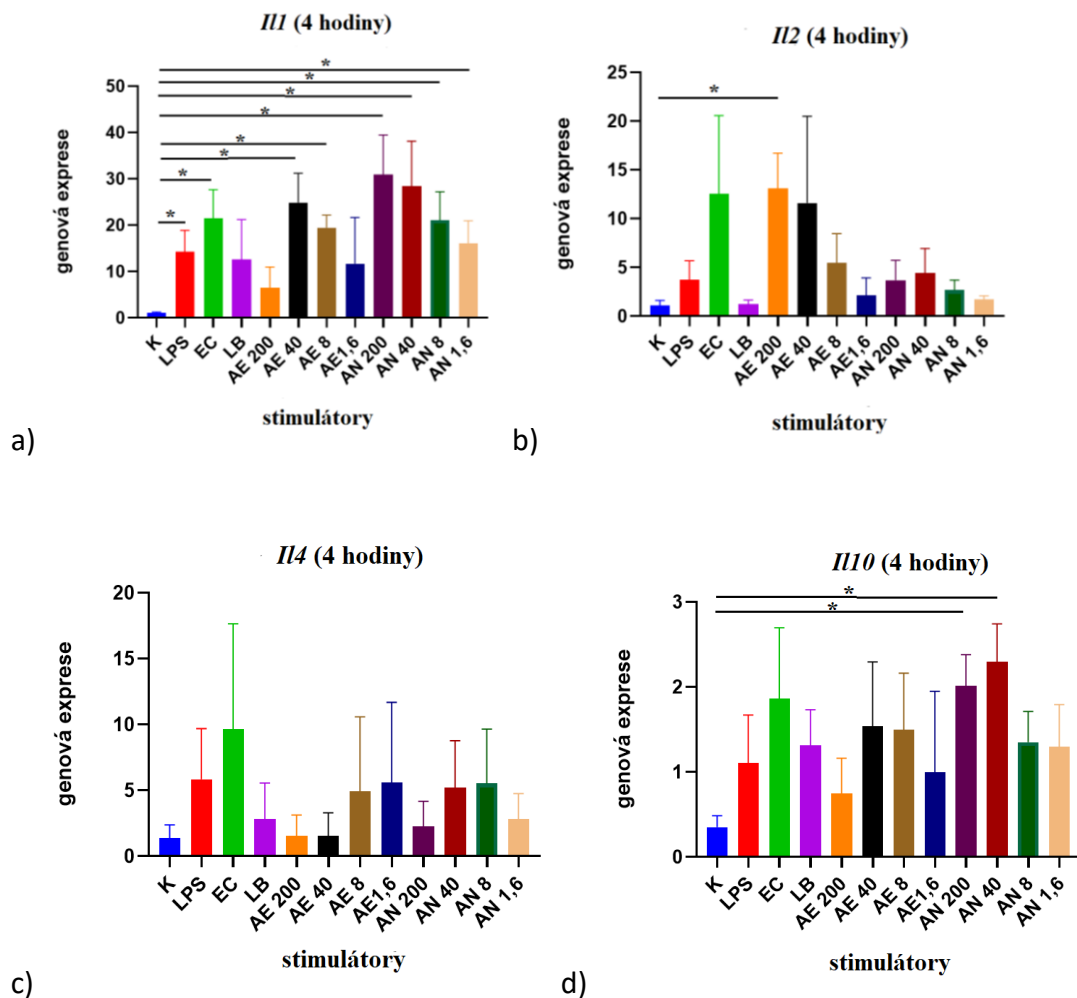
Obrázek 7: Vliv různých koncentrací metabolitů na buňky mononukleární frakce po jedné hodině stimulace (K – nestimulovaná kontrola, LPS – lipopolysacharid, EC – celá *E. coli*, LB – LB medium, AE – aerobní kultivace *E. coli* s různými koncentracemi metabolitů (200,40,8,1.6), AN – anaerobní kultivace *E. coli* s různými koncentracemi metabolitů (200,40,8,1.6))

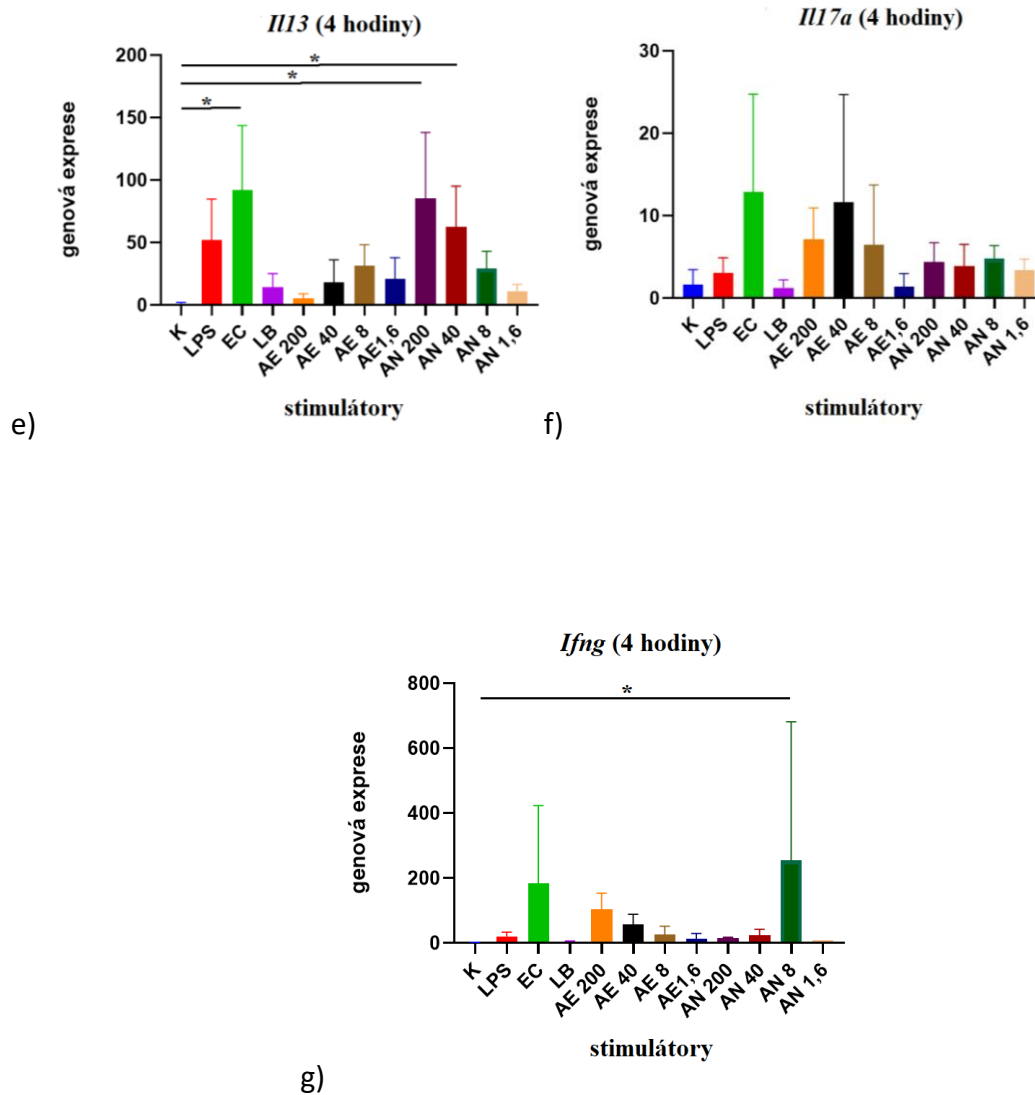
- a) Vliv metabolitů na genovou expresi *Il1*
- b) Vliv metabolitů na genovou expresi *Il2*
- c) Vliv metabolitů na genovou expresi *Il4*
- d) Vliv metabolitů na genovou expresi *Il10*
- e) Vliv metabolitů na genovou expresi *Il13*
- f) Vliv metabolitů na genovou expresi *Il17a*
- g) Vliv metabolitů na genovou expresi *Ifn*g

7.2 Vliv metabolitů na změnu genové exprese v PBMC po 4 hodinách stimulace

Hodnoty genové exprese *Il1* (obrázek 9a) po čtyřhodinové stimulaci PBMC měly statisticky významné výsledky oproti nestimulované kontrole. V porovnání s nestimulovanou kontrolou nacházíme významnou změnu genové exprese u obou pozitivních kontrol LPS ($p = 0,0073$) a EC ($p = 0,0048$), u metabolitů aerobní kultivace *E. coli* při použité koncentraci AE 40 ($p = 0,0029$) a AE 8 ($p = 0,0003$) a u všech použitých koncentrací metabolitů z anaerobní kultivace *E. coli* AN 200 ($p = 0,0038$), AN 40 ($p = 0,0080$), AN 8 ($p = 0,0047$) a AN 1,6 ($p = 0,0058$). U genové exprese *Il2* (obrázek 9b) byla naměřena statisticky významná hladina změny genové exprese pouze u AE 200, která dosahovala hodnoty $p = 0,0046$. U genové exprese *Il4* (obrázek 9c) nebyly naměřeny žádné statisticky významné výsledky. Hladiny genové exprese *Il10* (obrázek 9d) ukazují

zvýšenou hladinu exprese oproti nestimulované kontrole u EC, kdy $p = 0,0359$ a metabolitů z anaerobní kultivace *E. coli* při použitých koncentracích AN 200, která měla hodnotu $p = 0,0018$ a AN 40, kdy $p = 0,0020$. Genová exprese *II13* (obrázek e) byla statisticky významná v porovnání s nestimulovanou kontrolou u přidaných stimulátorů EC ($p = 0,0381$), AN 200 ($p = 0,0496$) a AN 40 ($p = 0,0306$). Při porovnání pozitivní kontroly EC a AN 200 můžeme říci, že AN 200 inhibuje genovou expresi *II13*. U genové exprese *II17a* (obrázek 9f) byly naměřeny na první pohled vyšší hodnoty hladin EC, AE 200, AE 40 a AE 8 než hodnoty nestimulované kontroly, nicméně žádný z těchto výsledků není statisticky významný. Hladina genové exprese u *Ifn*g byla statisticky vyšší u stimulovaných PBMC oproti nestimulované kontrole, a to konkrétně u metabolitů z aerobní kultivace *E. coli* při použitých koncentracích AE 200 ($p = 0,0230$) a AE 40 ($p = 0,0330$).





Obrázek 8: Vliv různých koncentrací metabolitů na buňky mononukleární frakce po čtyřech hodinách stimulace (K – nestimulovaná kontrola, LPS – lipopolysacharid, EC – celá *E. coli*, LB – LB medium, AE – aerobní kultivace *E. coli* s různými koncentracemi metabolitů (200,40,8,1.6), AN – anaerobní kultivace *E. coli* s různými koncentracemi metabolitů (200,40,8,1.6))

- a) Vliv metabolitů na genovou expresi Il1
- b) Vliv metabolitů na genovou expresi Il2
- c) Vliv metabolitů na genovou expresi Il4
- d) Vliv metabolitů na genovou expresi Il10
- e) Vliv metabolitů na genovou expresi Il13
- f) Vliv metabolitů na genovou expresi Il17a
- g) Vliv metabolitů na genovou expresi Ifng

8 DISKUZE

Z výsledků této bakalářské práce vyplývá, že po stimulaci metabolity z anaerobní kultivace *E. coli* dokážeme zvýšit produkci protizánětlivých cytokinů IL-10, IL-13 a prozánětlivého cytokinu IL-1 v buňkách mononukleární frakce leukocytů získaných z lidské periferní krve. Metabolity z anaerobní stimulace *E. coli* mají schopnost zvýšit genovou expresi prozánětlivého *Il1*, *Ifng* a protizánětlivého *Il2*. Tyto poznatky můžeme uplatnit pro lepší pochopení mechanismů působení probiotik a jejich uplatnění při možné prevenci vzniku alergických onemocnění a jiných dysfunkcích imunitního systému.

IL-1 je prozánětlivý cytokin, který je syntetizován a vylučován různými buňkami a tkáněmi v reakci na infekci. Podílí se na indukci proteinů akutní fáze, vzniku horečky a šoku – tyto projevy můžeme sledovat během sepse. Septický inzult je typický pro gramnegativní bakteriální infekci. V roce 2004 tým odborníků pod vedením J. M. Kima zkoušel prokázat, jestli *E. coli* reguluje expresi prozánětlivých cytokinů granulocytárních / makrofágových liniích. Došli k tomu závěru, že infekce vyvolaná *E. coli* způsobuje expresi *Il1*, *Il6*, *Il8* a *Tnfa* v buňkách CD34+. [78] Dle výsledků této práce došlo u *Il1* po čtyřhodinové stimulaci PBMC ke zvýšení genové exprese po přidání metabolitů z anaerobní (AN 200, AN 40, AN 8, AN 1,6) i aerobní (AE 40, AE 8) kultivace *E. coli*. Toto poznání nás vede k tomu, že probiotická vakcína z *E. coli* způsobuje expresi *Il1*, který může hrát svou roli např. při patogenezi diabetu 2. typu i mnohočetného myelomu.

Výzkum Súkeníkové z roku 2017 potvrdil schopnost CD4, které byly stimulované *E. coli* 083, vylučovat protizánětlivý cytotoxin *Il10* a prozánětlivý *Ifng*, což jsou cytokiny, které podporují imunitní odpověď Th1. Imunitní odpověď Th1 je u alergických dětí snížena. [79] V našem experimentu po čtyřhodinové stimulaci PBMC metabolity z anaerobní kultivace *E. coli* (AN 200 a AN 40) došlo k indukci genové exprese *Il10* a zároveň nedošlo ke zvýšení exprese *Ifng* v PBMC. Zvýšená hladina IL-10 má za následek sníženou hladinu zánětlivého cytokinu IFNg, tudíž můžeme říci, že metabolity z anaerobní kultivace *E. coli* o koncentraci AN 200 a AN 40 mohou zabránit lokálnímu výskytu zánětlivých onemocnění a mohly by být v budoucnu použity i jako

doplňková terapie s klasickými léčbami. Jako další využití metabolitů z anaerobní kultivace *E. coli* AN 200 a AN 40 můžeme najít v prevenci IBD (idiopatické střevní záněty). [80]

Súkeníková ve své práci uváděla, že po stimulaci buněk probiotickou *E. coli* došlo ke zvýšení tvorby Th17 lymfocytů, čímž předpokládá zvýšenou genovou expresí *IL17*, která by mohla částečně kompenzovat potlačenou odpověď Th1. [79] V našem experimentu se po stimulaci metabolity z anaerobní a aerobní kultivace *E. coli* jsme nepozorovali zvýšené hodnoty *IL17*. *IL-17* je prozánětlivý cytokin, který hraje významnou roli především v obraně proti infekčním onemocněním způsobenými kvasinkami, bakteriemi a plísněmi. [77] *IL-17* je zároveň zodpovědný za různé patologické stavy v lidském těle, jako je například psoriáza, revmatoidní artritida nebo poškození sítnice. Ukázalo se, že metabolity z aerobní kultivace *E. coli* AE 1,6 dokáží inhibovat genovou expresi *IL17*.

IL-4 a *IL-13* jsou hlavními iniciátory zánětů dýchacích cest, zejména se s nimi můžeme setkat u astmatu. *IL-4* podněcuje nezralé T-buňky, aby se vyvinuly do Th2 buněk. *IL-13* se podílí na fibróze a brání hojení tkání při infekcích. [81] Ukázalo se, že metabolit z aerobní kultivace *E. coli* AE 200 dokáže inhibovat genovou expresi *IL13*. Patrná byla i inhibice *IL4*, která ovšem nedosahovala dostatečné hladiny pro statistickou významnost. Měření genových expresí proběhlo 4 hodiny po přidání stimulantu, znatelnější inhibice bychom se možná dočkali po 24-hodinové stimulaci. V budoucnu by se mohly využívat probiotika s AE 200 jako léky proti astmatickým onemocněním.

Jedním z hlavních důvodů využívání probiotik je přechod z Th2 na Th1 buňky, abychom snížily výskyt alergických reakcí. PBMC byly stimulovány metabolity z aerobní kultivace *E. coli* AE 200 a AE 40, byla naměřena zvýšená hladina genové exprese *Ifng*. Tyto výsledky jsou podpořeny experimentem, který byl proveden *in vitro*. Byly stimulovány myší i lidské leukocyty bakteriemi mléčného kvašení a byla sledována produkce *Ifng*. [82] Schopnost odpovědi posunout se z Th2 na Th1 můžeme využívat u zánětlivých onemocnění jako například atopie. *IFNg* funguje jako antivirotikum, slouží k modulaci našeho imunitního systému a zároveň je schopen potlačovat nádorové

buňky. Z těchto informací můžeme usoudit, že AE 200 a AE 40 může být použito v probiotických vakcínách k posílení imunitního systému tím, že budou aktivovat makrofágy a NK buňky.

Ulf Helwig ve své studii zkoumal, zda je stimulace PBMC různými probiotickými kmeny podobná nebo druhově specifická. V jeho studii byly použity 3 kmeny bifidobakterií, 4 kmeny laktobacilů a *E. coli Nissle*. Buňky inkuboval po dobu 36 hodin a následně stanovoval pomocí metody ELISA IL-10, IL-11 a TNF (tumor nekrotický faktor). Všechny bakterie byly inkubovány anaerobně při 37 °C. Tato studie došla k závěru, že každá probiotická bakterie funguje podle specifického vzorce a ve svém fungování je odlišná. Buněčný extrakt z *E. coli Nissle* měl vyšší stimulační schopnost produkovat *IL1* v PBMC než laktobacily a bifidobakterie. Buněčné zbytky i extrakt z *E. coli Nissle* měly stimulační schopnosti již při nízkých koncentracích. Což je v souladu s naším experimentem, kdy po přidání metabolitů z anaerobní kultivace *E. coli* docházelo ke zvýšené genové expresi *IL1* již při nízkých dávkách AN 1,6. Zároveň jsme v našem pokusu zaznamenali u nižších koncentrací metabolitů z aerobně kultivované *E. coli* vyšší hladinu genové exprese *IL1* než u vyšších koncentrací AE 200, které byly až 2x menší. Buněčné extrakty ze všech zkoumaných kmenů laktobacilů měly slabou stimulační kapacitu *IL10*. Buněčné zbytky z bifidobakterií stimulovaly produkci *IL10* v PBMC výrazněji než laktobacily. Supernatanty s *E. coli* měly podobnou stimulační schopnost *IL10* jako bifidobakterie, ale významnější schopnost než laktobacily. *E. coli* měla dokonce vyšší stimulační schopnost *IL10* při nižších koncentracích než při vyšších. V našem případě docházelo ke zvýšené genové expresi *IL10* pouze u metabolitů z anaerobní kultivace *E. coli*, které měly vyšší koncentrace AN 200 a AN 40. U nižších koncentrací AN 8 a AN 1,8 je sice viditelná vyšší hladina genové exprese *IL10*, ovšem není statisticky významná. Řešením tohoto problému by mohlo být využití dat z vícero pokusů (v našem experimentu jsou data pouze ze 3 pokusů). Vyšší odpověď *IL10* na bifidobakterie a *E. coli Nissle* odpovídá pozitivnímu účinku těchto probiotických kmenů pro zánětlivá onemocnění střev ve srovnání s negativními výsledky u laktobacilů. [83]

Tým vedený čínským vědcem Man Chin Hua zkoumal imunitní odpověď PBMC a DC, které byly stimulovány probiotickým přípravkem Bio-Three. Bio-Three je probiotický přípravek, který obsahuje směs *Bacillus mesentericus*, *Clostridium butyricum* a *Enterococcus faecalis*. V jejich experimentu došlo po stimulaci PBMC ke zvýšení *Ifn γ* a *IL10* a zároveň ke snížení exprese *IL4* a *TNF*. Z tohoto výsledku můžeme usoudit, že přípravek Bio-Three stimuluje Th1 imunitní odpověď, indukuje protizánětlivé cytokiny *IL10* a potlačuje prozánětlivé cytokiny *TNF*. [86] V našem experimentu došlo po přidání metabolitů z anaerobních kultivací *E. coli* AN 200 a AN 40 ke zvýšení genové exprese *IL10*, ovšem nedošlo ke zvýšení hladin *Ifn γ* . Zvýšenou hladinu *Ifn γ* jsme zaznamenali po přidání metabolitů AN 8 a AN 1,6. Mluvíme bohužel pouze u zvýšených hladinách, protože výsledky nejsou statisticky významné. Mohlo by ovšem dojít ke změně, kdybychom statistické měření provedli na více vzorcích za delší dobu stimulace. Významnou hladinu genové exprese *Ifn γ* jsme zaznamenali po přidání metabolitů z aerobní kultivace *E. coli* AE 200 a AE 40. Z tohoto výsledku můžeme usoudit, že metabolity z aerobní i anaerobní kultivace *E. coli* AN 200 a AN 40 zesilují imunitní odpověď Th1.

V roce 2018 byl proveden experiment pro hodnocení účinku probiotik na hladiny cytokinů u kriticky nemocných dětí s těžkou sepsí. Dětem byla podávána probiotická vakcína VSL3, která obsahovala *Lactobacillus paracasei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *Bifidobacterium longum*, *B. infantis*, *B. breve*, *Streptococcus salivarius*. Byly prokázány snížené hladiny prozánětlivých cytokinů IL-12, IL-17, TNF a zvýšené hladiny protizánětlivého cytokinu IL-10. [88] Jak už bylo výše uvedeno v našem pokusu došlo ke zvýšení hladin exprese *IL10* po přidání metabolitů z anaerobní kultivace *E. coli* AN 200 a AN 40. Proto se můžeme domnívat, že tyto metabolity mohou být prospěšné i v léčbě sepsí.

Alergická polysenzibilizace postihuje velké množství lidí. Ve studii z roku 2019 byly stimulovány plicní a střevní epitelální buňky MODE-K a MLE-12 kmenem *E. coli* Nissle. Byly prokázány zvýšené hladiny genové exprese *IL6* a *IL10*. Kmen *E. coli* Nissle by mohl být použit jako bezpečné řešení proti alergiím, protože trvale nekolonizuje nos, plíce ani střeva. [87] V našem experimentu došlo po přidání metabolitů z anaerobní kultivace

E. coli AN 200 a AN 40 ke zvýšení hladiny genové exprese *IL10*. Můžeme tedy říci, že tyto metabolity mohou najít svoje uplatnění pro potlačení alergií.

Z našich výsledků je patrné, že různé koncentrace metabolitů z aerobní a anaerobní kultivace *E. coli* mohou být použité ke stimulaci Th1 imunitní odpovědi a tím být prospěšné pro autoimunitní nemoci, záněty i alergie. Většina těchto metabolitů ovšem stimuluje i prozánětlivý IL-1. Díky genovému inženýrství by bylo v budoucnu možné upravit geny, které jsou za stimulaci tohoto cytokinu zodpovědné.

Experimentální část by mohla být vylepšena delší dobou stimulace buněk. Z grafů je patrné, že některé hladiny genové exprese jsou vyšší po 4hodinové stimulaci než po 1hodinové stimulaci, např. hodnoty *IL13* po přidání metabolitů z anaerobní kultivace *E. coli* AN 200 a AN 40. Zvýšení doby stimulace (např. 24 hodin) by nám pomohlo určit čas, ve kterém je hladina genové exprese daného cytokinu nejvyšší.

Ze statistického hlediska by bylo určitě výhodnější pracovat s větším množstvím dat (pokusů). V praktické části byla použita data pouze ze 3 experimentů, což je pro statistické vyhodnocení velmi slabé.

9 ZÁVĚR

V teoretické části bakalářské práce byly shrnuty informace o probiotických bakteriích a o jejich schopnostech tvořit mastné kyseliny. Dále byly popsány různé probiotické přípravky, které mají imunomodulační účinky a svým působením ovlivňují náš imunitní systém.

V praktické části bakalářské práce bylo zjištěno, že metabolity z aerobní i anaerobní kultivace *E. coli* mohou úspěšně modifikovat imunitní odpověď tak, aby modulovaly hladiny specifických aktivačních molekul, jako jsou cytokiny. Ačkoliv některé metabolity stimulují jak prozánětlivé, tak protizánětlivé cytokiny, v budoucnu pomocí moderních technik genového inženýrství bude teoreticky možné metabolity upravit tak, aby vykazovaly prospěšné vlastnosti, které od nich budou požadovány. Takto upravené metabolity mohou být použity v probiotických vakcínách. Tyto vakcíny mohou být využity v léčbě různých autoimunitních a zánětlivých onemocnění jako léčba IBD, léčba alergií či astmatu.

10 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

DIC	Diseminovaná intravaskulární koagulace
APC	Antigen-presenting cells; Antigen prezentující buňky
ATP	Adenosintrifosfát
BMK	Bakterie mléčného kvašení
bp	Base pair; pár bazí
CD	Crohnova choroba
CRC	Karcinom kolorekta
DAEC	Difuzně adherentní kmeny
DC	Dendritic cells; Dendritické buňky
DNA	Deoxyribinukleová kyselina
E. coli	Escherichia coli
EAEC	Enteroagregativní kmeny
EHEC	Enterohemoragické kmeny
EIEC	Enteroinvazivní kmeny
EPEC	Enteropatogenní kmeny
ETEC	Enterotoxigenní kmeny
FAO	Food and Agriculture Organization; Organizace pro výživu a zemědělství
FBS	Fetal bovine serum; hovězí sérum z plodu
Fc	Fragment Crystallizable
FFAR	Free Fatty Acid Receptor; receptor volných mastných kyselin
GIT	Gastrointestinální trakt
HDAC	Histoneacetyláza
HIV	Human Immunodeficiency Virus; lidský virus imunitní nedostatečnosti
HUS	Hemolyticko-uremický syndrom
IBD	Idiopatické střevní záněty
IgA	Imunoglobulin A
IgE	Imunoglobulin E
IL-1	Interleukin 1
IL-10	Interleukin 10

IL-17a	Interleukin 17 alfa
IL-2	Interleukin 2
IL-4	Interleukin 4
IS	Imunitní systém
MAMP	Microbe Associated Molecular Patterns
MHC	Major Histocompatibility complex
NDC	Non-Digestible Carbonhydrates
NFkB	Nukleární faktor kappa B
NK	Nukleová kyselina
NMEC	Kmeny způsobující novorozeneckou meningitidu
PEP	Fosfoenolpyruvát
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell; Mononukleární buňky periferní krve
PBS	Phosphate-Buffered Saline; Fosfátový pufr
PPR	Pattern Recognition Receptor; receptory pro primitivní vzory
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction; Polymerázová řetězová reakce v reálném čase
SCFA	Short-Chain Fatty Acid; Krátké řetězce mastných kyselin
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome; Syndrom systémové zánětlivé odpovědi
TLR	Toll-like Receptor, receptor podobný genu Toll
UC	Ulcerázní kolitida
UPEC	Uropatogenní kmeny
WHO	World Health Organization; Světová zdravotnická organizace

11 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] Brenner DJFarmer JJ III (2007) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 587–850, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2, New York, Springer, The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria.

[2] Leimbach A, Hacker J, Dobrindt U. E. coli as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013;358:3-32. doi: 10.1007/82_2012_303. PMID: 23340801.

[3] O'LEARY, William M. THE FATTY ACIDS OF BACTERIA. *Bacteriological Reviews* [online]. 1962, **26**(4), 421-447 [cit. 2022-04-25]. ISSN 0005-3678. Dostupné z: doi:10.1128/br.26.4.421-447.1962

[4] Douglas J. Morrison & Tom Preston (2016) Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism, *Gut Microbes*, 7:3, 189-200, DOI: 10.1080/19490976.2015.1134082

[5] Ang Z, Xiong D, Wu M, Ding JL. FFAR2-FFAR3 receptor heteromerization modulates short-chain fatty acid sensing. *FASEB J*. 2018 Jan;32(1):289-303. doi: 10.1096/fj.201700252RR. Epub 2017 Sep 7. PMID: 28883043; PMCID: PMC5731126.

[6] SCHULTHESS, Julie, Sumeet PANDEY, Melania CAPITANI, et al. The Short Chain Fatty Acid Butyrate Imprints an Antimicrobial Program in Macrophages. *Immunity* [online]. 2019, **50**(2), 432-445.e7 [cit. 2022-05-05]. ISSN 10747613. Dostupné z: doi:10.1016/j.immuni.2018.12.018

[7] LOUIS, Petra a Harry J. FLINT. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environmental Microbiology* [online]. 2016, **19**(1), 29-41 [cit. 2022-05-09]. ISSN 1462-2912. Dostupné z: doi:10.1111/1462-2920.13589

[8] Mueller M, Tainter CR. Escherichia Coli. 2021 Oct 21. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022. PMID: 33231968.

[9] MICENKOVA, Lenka. Bakterie Escherichia coli – od nezbytného komezála po nebezpečného patogena. *Ze současné medicíny*, 14-22 (2016)

[10] Croxen, M., Finlay, B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* **8**, 26–38 (2010). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2265>

[11] Súkeníková L, Černý V, Novotná O, Petrásková P, Boráková K, Kolářová L, Prokešová L, Hrdý J. Different capacity of in vitro generated myeloid dendritic cells of newborns of healthy and allergic mothers to respond to probiotic strain *E. coli* O83:K24:H31. *Immunol Lett.* 2017 Sep;189:82-89. doi: 10.1016/j.imlet.2017.05.013. Epub 2017 May 26. PMID: 28554713.

[12] PARKIN, Jacqueline a Bryony COHEN. An overview of the immune system. *The Lancet* [online]. 2001, **357**(9270), 1777-1789 [cit. 2022-05-06]. ISSN 01406736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(00)04904-

[13] HOŘEJŠÍ, V. BARTŮŇKOVÁ, J. BRDIČKA, T. ŠPÍŠEK, R. Základy imunologie. 5. vydání. Praha: TRITON, 2013. ISBN 978-80-7387-713-2.

[14] S. Scheurer, M. Toda, S. Vieths, What makes an allergen?, *Clin. Exp. Allergy.* 45 (2015) 1150–1161. doi:10.1111/cea.12571.

[15] REE, Ronald, Lone HUMMELSHØJ, Maud PLANTINGA, Lars K POULSEN a Emily SWINDLE. Allergic sensitization: host-immune factors. *Clinical and Translational Allergy* [online]. 2014, **4**(1) [cit. 2022-04-25]. ISSN 2045-7022. Dostupné z: doi:10.1186/2045-7022-4-12

[16] Van der Meide PH, Schellekens H. Cytokines and the immune response. *Biotherapy.* 1996;8(3-4):243-9. doi: 10.1007/BF01877210. PMID: 8813336.

[17] Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin.* 2007;45(2):27-37. doi:10.1097/AIA.0b013e318034194e

[18] Gupta V, Garg R. Probiotics. *Indian J Med Microbiol.* 2009 Jul-Sep;27(3):202-9. doi: 10.4103/0255-0857.53201. PMID: 19584499.

[19] Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. *World Health Organization [online]*, (2001).

[20] Williams NT. Probiotics. *Am J Health Syst Pharm.* 2010 Mar 15;67(6):449-58. doi: 10.2146/ajhp090168. PMID: 20208051.

[21] Parvez S., Malik K.A., Ah Kang S., Kim H.Y. (2006): Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J. Appl. Microbiol.* 100(6): 1171–1185.

- [22] Agerholm-Larsen, L., Raben, A., Haulrik, N., Hansen, A.S., Manders, M. and Astrup, A. (2000) Effect of 8 week intake of probiotic milk products on risk factors for cardiovascular diseases. *Eur J Clin Nutr* **54**, 288–289.
- [23] Schultz, M. and Sartor, R.B. (2000) Probiotics and inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol* **95**, 19S–21S.
- [24] Marteau, P., De Vrese, M., Cellier, C.J. and Schrezenmeir, J. (2001) Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am J Clin Nutr* **73**, 430S–436S.
- [25] Bengmark, S. (2000) Colonic food: pre- and probiotics. *Am J Gastroenterol* **95**, S5–S7.
- [26] Ouwehand, A.C., Salminen, S. and Isolauri, E. (2002) Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek* **82**, 279–289
- [27] Nobaek, S., Johansson, M.L. and Molin, G. (2000) Alteration of intestinal microflora is associated with reduction in abdominal bloating and pain in patients with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* **95**, 1231–1238
- [28] Walker, W.A. (2000) Role of nutrients and bacterial colonization in the development of intestinal host defense. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **30**, S2–S7.
- [29] Blaut M. Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. *Eur J Nutr*. 2002 Nov;41 Suppl 1:111-6. doi: 10.1007/s00394-002-1102-7. PMID: 12420111.
- [30] Shulman ST, Friedmann HC, Sims RH (2007) Theodor Escherich: the first pediatric infectious diseases physician? *Clinical Infectious Diseases* **45**:1025–1029.
- [31] GRIFFIN, Patricia M. Illnesses Associated with Escherichia coli O157: H7 Infections. *Annals of Internal Medicine* [online]. 1988, **109**(9) [cit. 2022-05-05]. ISSN 0003-4819. Dostupné z: doi:10.7326/0003-4819-109-9-705
- [32] NOWROUZIAN, Forough, Bill HESSELMAR, Robert SAALMAN, Inga-Lisa STRANNEGÅRD, Nils ÅBERG, Agnes E WOLD a Ingegerd ADLERBERTH. Escherichia coli in Infants' Intestinal Microflora: Colonization Rate, Strain Turnover, and Virulence Gene Carriage. *Pediatric Research* [online]. 2003, **54**(1), 8-14 [cit. 2022-05-05]. ISSN 0031-3998. Dostupné z: doi:10.1203/01.PDR.0000069843.20655.EE
- [33] TOMAS, Julie, Julie REYGNER, Camille MAYEUR, et al. Early colonizing Escherichia coli elicits remodeling of rat colonic epithelium shifting toward a new homeostatic

state. *The ISME Journal* [online]. 2015, **9**(1), 46-58 [cit. 2022-05-05]. ISSN 1751-7362. Dostupné z: doi:10.1038/ismej.2014.111

[34] ADLERBERTH, Ingegerd, Erika LINDBERG, Nils ÅBERG, Bill HESSELMAR, Robert SAALMAN, Inga-Lisa STRANNEGÅRD a Agnes E WOLD. Reduced Enterobacterial and Increased Staphylococcal Colonization of the Infantile Bowel: An Effect of Hygienic Lifestyle?. *Pediatric Research* [online]. 2006, **59**(1), 96-101 [cit. 2022-05-05]. ISSN 0031-3998. Dostupné z: doi:10.1203/01.pdr.0000191137.12774.b2

[35] MOELLER, Andrew H., Yingying LI, Eitel MPOUDI NGOLE, et al. Rapid changes in the gut microbiome during human evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2014, **111**(46), 16431-16435 [cit. 2022-05-05]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1419136111

[36] AZAD, Meghan B., Theodore KONYA, Heather MAUGHAN, et al. Gut microbiota of healthy Canadian infants: profiles by mode of delivery and infant diet at 4 months. *Canadian Medical Association Journal* [online]. 2013, **185**(5), 385-394 [cit. 2022-05-05]. ISSN 0820-3946. Dostupné z: doi:10.1503/cmaj.121189

[37] Brenner DJFarmer JJ III (2007) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 587–850, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2, New York, Springer, The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria.*

[38] KAMIONKA, Mariusz. Engineering of Therapeutic Proteins Production in *Escherichia coli*. *Current Pharmaceutical Biotechnology* [online]. 2011, **12**(2), 268-274 [cit. 2022-05-05]. ISSN 13892010. Dostupné z: doi:10.2174/138920111794295693

[39] BLOUNT, Zachary D. The unexhausted potential of *E. coli*. *ELife* [online]. 2015, **4** [cit. 2022-04-07]. ISSN 2050-084X. Dostupné z: doi:10.7554/eLife.05826

[40] FULLER, Roy. History and development of probiotics. FULLER, Roy. *Probiotics* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 1992, 1992, s. 1-8 [cit. 2022-04-07]. ISBN 978-94-010-5043-2. Dostupné z: doi:10.1007/978-94-011-2364-8_1

[41] Gómez-Llorente C, Muñoz S, Gil A: Role of Toll-like receptors in the development of immunotolerance mediated by probiotics. *Proc Nutr Soc* 2010; 69: 381–389.

[42] Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker CJ: Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with com-mensals and pathogens. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8: 171–184.

[43] Holzapfel H. W., Haberer P., Geisen R., Bjorkroth J., Schillinger U. (2001): Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73(2 Suppl): 365-373

[44] Cukrowska B, Lodínová-[®]ádníková R, Enders C, et al. Specific proliferative and antibody responses of premature infants to intestinal colonization with nonpathogenic probiotic *E. coli* strain Nissle 1917. *Scand J Immunol* 2002;55: 204–9.

[45] WASSENAAR, Trudy M. Insights from 100 years of research with probiotic *E. coli*. *European Journal of Microbiology and Immunology* [online]. 2016, 6(3), 147-162 [cit. 2022-04-07]. DOI: 10.1556/1886.2016.00029. ISSN 2062-509X.

[46] Zschüttig A, Auerbach C, Meltke S, Eichhorn C, Brandt M, Blom J, Goesmann A. Complete Sequence of Probiotic Symbioflor 2 *Escherichia coli* Strain. *Genome Announc.* 2015; 3:9–10.

[47] Martens U, Enck P, Zieseniss E. Probiotic treatment of irritable bowel syndrome in children. *Ger Med Sci.* 2010 Mar 2;8:Doc07. doi: 10.3205/000096. PMID: 20234804; PMCID: PMC2839254.

[48] KOCIJANCIC, Dino, Sebastian FELGNER, Michael FRAHM, et al. Therapy of solid tumors using probiotic Symbioflor-2 - restraints and potential. *Oncotarget* [online]. 2016, 7(16), 22605-22622 [cit. 2022-04-08]. ISSN 1949-2553. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.8027

[49] Jacobi CA, Malfertheiner P. *Escherichia coli* Nissle 1917 (Mutaflor): new insights into an old probiotic bacterium. *Dig Dis.* 2011;29(6):600-7. doi: 10.1159/000333307. Epub 2011 Dec 12. PMID: 22179217.

[50] LODINOVÁ-ZÁDNÍKOVÁ, Rája, Helena TLASKALOVÁ a Zdena BARTÁKOVÁ. The Antibody Response in Infants After Colonization of the Intestine with *E. coli* O83. Artificial Colonization Used as a Prevention Against Nosocomial Infections. MESTECKY, Jiri, Claudia BLAIR a Pearay L. OGRA, ed. *Immunology of Milk and the Neonate* [online]. Boston, MA: Springer US, 1991, 1991, s. 329-335 [cit. 2022-04-08]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. ISBN 978-1-4613-6713-0. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4615-3838-7_42

[51] LODINOVÁ-ZÁDNÍKOVÁ, Rája, Božena CUKROWSKA a Helena TLASKALOVA-HOGENOVA. Oral Administration of Probiotic *Escherichia coli* after Birth Reduces Frequency of Allergies and Repeated Infections Later in Life (after 10 and 20

Years). *International Archives of Allergy and Immunology* [online]. 2003, **131**(3), 209-211 [cit. 2022-04-08]. ISSN 1018-2438. Dostupné z: doi:10.1159/000071488

[52] . Carrico CJ, Meakins JL, Marshall JC, Fry D, Maier RV: MultipleorganYfailure syndrome. The gastrointestinal tract: the „motor“ of MOF. *Arch Surg* 121:196Y208, 1986

[53] HASSOUN, Heitham T., Bruce C. KONE, David W. MERCER, Frank G. MOODY, Norman W. WEISBRODT a Frederick A. MOORE. POST-INJURY MULTIPLE ORGAN FAILURE: THE ROLE OF THE GUT. *Shock* [online]. 2001, **15**(1), 1-10 [cit. 2022-04-08]. ISSN 1073-2322. Dostupné z: doi:10.1097/00024382-200115010-00001

[54] DEITCH, Edwin A., et al. Role of the gut in the development of injury-and shock induced SIRS and MODS: the gut-lymph hypothesis, a review. *Front Biosci*, 2006, 11.1: 520-528.

[55] COOPERSMITH, Craig M., et al. Inhibition of intestinal epithelial apoptosis and survival in a murine model of pneumonia-induced sepsis. *Jama*, 2002, 287.13: 1716-1721.

[56] ALVERDY, John C.; LAUGHLIN, Robert S.; WU, Licheng. Influence of the critically ill state on host-pathogen interactions within the intestine: gut-derived sepsis redefined. *Critical care medicine*, 2003, 31.2: 598-607.

[57] ACHESON, David WK; LUCCIOLI, Stefano. Mucosal immune responses. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 2004, 18.2: 387-404.

[58] HERSHBERG, Robert M.; MAYER, Lloyd F. Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells–polarity and complexity. *Immunology today*, 2000, 21.3: 123-128.

[59] PHILPOTT, Dana J.; GIRARDIN, Stephen E. Role Toll-like receptorů a Nod proteinů v bakteriální infekci. *Molecular immunology* , 2004, 41.11: 1099-1108.

[60] BRENCHLEY, Jason M., et al. Mikrobiální translokace je příčinou systémové imunitní aktivity u chronické infekce HIV. *Nature Medicine* , 2006, 12.12: 1365-1371.

[61] MACK, David R., et al. Extracelulární sekrece mucinu MUC3 sleduje adhezi kmenů *Lactobacillus* k buňkám střevního epitelu in vitro. *Gut* , 2003, 52.6: 827-833.

- [62] HOOPER, Lora V., et al. Angiogeniny: nová třída mikrobicidních proteinů zapojených do přirozené imunity. *Nature immunology*, 2003, 4.3: 269-273.
- [63] KELLY, Denise, et al. Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR- γ and RelA. *Nature immunology*, 2004, 5.1: 104-112.
- [64] MACPHERSON, Andrew J.; UHR, Therese. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science*, 2004, 303.5664: 1662-1665.
- [65] MACPHERSON, Andrew J., et al. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science*, 2000, 288.5474: 2222-2226.
- [66] VOTAVA, Miroslav et al. Lékařská mikrobiologie obecná. 2., přepr. vyd. Brno: Neptun, 2005, 351 s. ISBN 80-868-5000-5.
- [67] RAI, Ashutosh K., Angela M. MITCHELL a Danielle A. GARSIN. Enterobacterial Common Antigen: Synthesis and Function of an Enigmatic Molecule. *MBio* [online]. 2020, **11**(4), e01914-20 [cit. 2022-04-09]. ISSN 2161-2129. Dostupné z: doi:10.1128/mBio.01914-20
- [68] SKUPIN-MRUGALSKA, Paulina. Liposome-Based Drug Delivery for Lung Cancer. *Nanotechnology-Based Targeted Drug Delivery Systems for Lung Cancer* [online]. Elsevier, 2019, 2019, s. 123-160 [cit. 2022-04-09]. ISBN 9780128157206. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-815720-6.00006-X
- [69] LUZINA, Irina G., Achsah D. KEEGAN, Nicola M. HELLER, Graham A. W. ROOK, Terez SHEA-DONOHUE a Sergei P. ATAMAS. Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of "alternatives". *Journal of Leukocyte Biology* [online]. 2012, **92**(4), 753-764 [cit. 2022-04-09]. ISSN 07415400. Dostupné z: doi:10.1189/jlb.0412214
- [70] ISLAM, Hashim, Thomas C. CHAMBERLAIN, Alice L. MUI a Jonathan P. LITTLE. Elevated Interleukin-10 Levels in COVID-19: Potentiation of Pro-Inflammatory Responses or Impaired Anti-Inflammatory Action?. *Frontiers in Immunology* [online]. 2021, **12** [cit. 2022-04-09]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2021.677008
- [71] WITOWSKI, J.; KSIĄŻEK, K.; JÖRRES, A. Interleukin-17: mediátor zánětlivých reakcí. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 2004, 61.5: 567-579.

- [72] DINARELLO, Charles A. Biology of interleukin 1. *The FASEB Journal* [online]. 1988, **2**(2), 108-115 [cit. 2022-04-09]. ISSN 0892-6638. Dostupné z: doi:10.1096/fasebj.2.2.3277884
- [73] Zbořil a kol. Prebiotika a probiotika. In: Idiopatické střevní záněty. Praha: Mladá fronta a.s. 2018: 353–355.
- [74] Mellman I. Dendritic cells: master regulators of the immune response. *Cancer Immunol Res.* 2013 Sep;1(3):145-9. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0102. PMID: 24777676.
- [75] PALUDAN. Interleukin-4 and Interferon- γ : The Quintessence of a Mutual Antagonistic Relationship. *Scandinavian Journal of Immunology* [online]. 1998, **48**(5), 459-468 [cit. 2022-04-17]. ISSN 03009475. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-3083.1998.00435.x
- [76] MANNON, Peter a Walter REINISCH. Interleukin 13 and its role in gut defence and inflammation. *Gut* [online]. 2012, **61**(12), 1765-1773 [cit. 2022-05-03]. ISSN 0017-5749. Dostupné z: doi:10.1136/gutjnl-2012-303461
- [77] ZENOBIA, Camille a George HAJISHENGALLIS. Basic biology and role of interleukin-17 in immunity and inflammation. *Periodontology 2000* [online]. 2015, **69**(1), 142-159 [cit. 2022-05-03]. ISSN 09066713. Dostupné z: doi:10.1111/prd.12083
- [78] KIM, J M, Y-K OH, Y-J KIM, J YOUN a M-J AHN. Escherichia coli up-regulates proinflammatory cytokine expression in granulocyte/macrophage lineages of CD34+ stem cells via p50 homodimeric NF- κ B. *Clinical and Experimental Immunology* [online]. 2004, **137**(2), 341-350 [cit. 2022-05-03]. ISSN 0009-9104. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2249.2004.02542.x
- [79] SÚKENÍKOVÁ Lenka, Viktor ČERNÝ a Olga NOVOTNÁ. Different capacity of in vitro generated myeloid dendritic cells of newborns of healthy and allergic mothers to respond to probiotic strain E. coli 083: K24. *Immunology Letters.* 2017, **189**, 82-89. DOI: 10.1016/j.imlet.2017.05.013. ISSN 01652478.
- [80] R. Kuhn, J. Lohler, D. Rennick, K. Rajewsky, and W. Muller, "Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis," *Cell*, vol. 75, no. 2, pp. 263–274, 1993.
- [81] MARONE, Giancarlo, Francescopaolo GRANATA, Valentina PUCINO, Antonio PECORARO, Enrico HEFFLER, Stefania LOFFREDO, Guy W. SCADDING a Gilda VARRICCHI. The Intriguing Role of Interleukin 13 in the Pathophysiology of Asthma. *Frontiers in*

Pharmacology [online]. 2019, **10** [cit. 2022-05-04]. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2019.01387

[82] CROSS, M.L., L.M. STEVENSON a H.S. GILL. Anti-allergy properties of fermented foods: an important immunoregulatory mechanism of lactic acid bacteria?. *International Immunopharmacology* [online]. 2001, **1**(5), 891-901 [cit. 2022-05-05]. ISSN 15675769. Dostupné z: doi:10.1016/S1567-5769(01)00025-X

[83] HELWIG, Ulf. Lactobacilli, bifidobacteria and E. coli nissle induce pro- and anti-inflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells. *World Journal of Gastroenterology* [online]. 2006, **12**(37) [cit. 2022-05-05]. ISSN 1007-9327. Dostupné z: doi:10.3748/wjg.v12.i37.5978

[84] Zhang, S.; Dogan, B.; Guo, C.; Herlekar, D.; Stewart, K.; Scherl, E.J.; Simpson, K.W. Short Chain Fatty Acids Modulate the Growth and Virulence of Pathosymbiont *Escherichia coli* and Host Response. *Antibiotics* **2020**, *9*, 462. Dostupné z: doi.org/10.3390/antibiotics9080462

[85] WANG, I.-K., Y.-Y WU, Y.-F YANG, et al. The effect of probiotics on serum levels of cytokine and endotoxin in peritoneal dialysis patients: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Beneficial Microbes* [online]. 2015, **6**(4), 423-430 [cit. 2022-05-05]. ISSN 1876-2883. Dostupné z: doi:10.3920/BM2014.0088

[86] HUA, Man-Chin. Probiotic Bio-Three induces Th1 and anti-inflammatory effects in PBMC and dendritic cells. *World Journal of Gastroenterology* [online]. 2010, **16**(28) [cit. 2022-05-06]. ISSN 1007-9327. Dostupné z: doi:10.3748/wjg.v16.i28.3529

[87] SARATE, P. J., S. HEINL, S. POIRET, M. DRINIĆ, C. ZWICKER, I. SCHABUSSOVA, C. DANIEL a U. WIEDERMANN. E. coli Nissle 1917 is a safe mucosal delivery vector for a birch-grass pollen chimera to prevent allergic poly-sensitization. *Mucosal Immunology* [online]. 2019, **12**(1), 132-144 [cit. 2022-05-11]. ISSN 1933-0219. Dostupné z: doi:10.1038/s41385-018-0084-6

[88] ANGURANA, Suresh K., Arun BANSAL, Sunit SINGHI, Ritu AGGARWAL, Muralidharan JAYASHREE, Manila SALARIA a Navdeep K. MANGAT. Evaluation of Effect of Probiotics on Cytokine Levels in Critically Ill Children With Severe Sepsis. *Critical Care Medicine* [online]. 2018, **46**(10), 1656-1664 [cit. 2022-05-06]. ISSN 0090-3493. Dostupné z: doi:10.1097/CCM.0000000000003279

[89] NOGAL, Ana, Ana M. VALDES a Cristina MENNI. The role of short-chain fatty acids in the interplay between gut microbiota and diet in cardio-metabolic health. *Gut*

Microbes [online]. 2021, **13**(1) [cit. 2022-05-09]. ISSN 1949-0976. Dostupné z:
doi:10.1080/19490976.2021.1897212

[90] NOGAL, Ana, Panayiotis LOUCA, Xinyuan ZHANG, et al. Circulating Levels of the Short-Chain Fatty Acid Acetate Mediate the Effect of the Gut Microbiome on Visceral Fat. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2021, **12** [cit. 2022-05-09]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2021.711359

12 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Různé patogenní kmeny E. coli kolonizující lidské tělo [10]	15
Obrázek 2: Cytokinová síť [17]	27
Obrázek 3: Působení probiotik.....	31
Obrázek 4: Rozdělení frakcí pomocí Ficollu.....	37
Obrázek 5: Bürkerova komůrka.....	38
Obrázek 6: Příklad NanoDrop One	42
Obrázek 7: Vliv různých koncentrací metabolitů na buňky mononukleární frakce po jedné hodině stimulace.....	47
Obrázek 8: Vliv různých koncentrací metabolitů na buňky mononukleární frakce po čtyřech hodinách stimulace	49

13 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1: Organismy používané jako probiotika – upraveno podle [43].....	33
Tabulka 2: Produkty z probiotické E. coli, převzato a upraveno [45]	34
Tabulka 3: Příprava kultivačního média	37
Tabulka 4: Stimulace buněk	39
Tabulka 5: Příprava lyzačního roztoku	40
Tabulka 6: Výsledné koncentrace RNA.....	42
Tabulka 7: Složení premixu.....	43
Tabulka 8: Nastavená cyklů pro přepis RNA do cDNA.....	43
Tabulka 9: Složení mixu	44
Tabulka 10: Použité próby	44
Tabulka 11: Nastavení cyklů pro PCR reakci.....	44

