

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
katedra biologických a lékařských věd

**Vliv probiotické bakterie *Lactobacillus paracasei* subsp.
paracasei na vývoj akutní kolitidy u BALB/c myší**

diplomová práce

Hradec Králové 2008

Martina Součková

Na tomto místě bych ráda poděkovala RNDr. Haně Kozákové, CSc. za cenné rady, odborné připomínky, trpělivost a čas, který mi při psaní práce věnovala.

Také bych chtěla poděkovat Mgr. Martinu Schwarzerovi a zaměstnancům Mikrobiologického ústavu AV ČR, v.v.i. v Novém Hrádku za veškerou jejich pomoc při vzniku této práce.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracovala samostatně a použila pouze pramenů, které uvádím v seznamu literatury.

V Hradci Králové dne 15. 5. 2008

Podpis

Abstrakt

Zánětlivá onemocnění střeva, mezi která patří ulcerózní kolitida a Crohnova choroba, jsou chronická relapsující onemocnění nejasné etiologie. Akutní ulcerózní kolitidu jsme u BALB/c myši vyvolali podáváním 3 % dextranulfátu sodného (DSS) v pitné vodě po dobu 5 dnů. Cílem studie bylo zhodnotit vliv bakterie *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P, která byla testována jako možné nové probiotikum, na vývoj střevního zánětu u experimentálního modelu akutní kolitidy. Laktobacily jsme myším aplikovali intragastricky 1., 4. a 8. den pokusu a poté po dobu pěti dnů společně s podáváním DSS. Kontrolní skupiny myši dostávaly podle stejného schématu místo probiotické bakterie MRSC médium nebo fosfátový pufr. Denně jsme sledovali klinické příznaky zánětu, jako je průjem, rektální krvácení a úbytek váhy myši. Metodou ELISA jsme stanovili hladiny cytokinů (IL-6, IL-10 a TNF- α) v supernatantech po 48hodinové kultivaci slezinných buněk, buněk mezenterálních lymfatických uzlin a střevních kousků. Histologicky jsme hodnotili stupeň poškození *colon descendens*. Myši prekolonizované *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P zůstaly po dobu pokusu zdravé bez příznaků těžkého střevního zánětu. Myši, které dostávaly laktobacily, neměly zkrácené tlusté střevo, což je jeden ze znaků střevního zánětu, jak tomu bylo u kontrol bez laktobacilů. Zjistili jsme, že podávání probiotické bakterie snížilo hladiny prozánětlivých cytokinů TNF- α a IL-6 v supernatantech po kultivaci *colon descendens*.

Dokázali jsme, že intragastrické podávání *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P ochránilo myši před vznikem těžkého střevního zánětu u experimentálního modelu akutní kolitidy a že tato bakterie má probiotické účinky.

Abstract

Inflammatory bowel disease - ulcerative colitis and Crohn's disease - are chronic relapsing intestinal disorders of unknown etiology. Acute ulcerative colitis was induced in BALB/c mice by 3 % dextran sulfate sodium (DSS) administrated in drinking water for 5 days. The effect of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P, a bacterium with potential probiotic influence, on the development of inflammation was evaluated. Lactobacillus was administrated intragastrically to mice on days 1, 4 and 8 and the administration continued for next 5 days during DSS treatment. Control groups received instead of lactobacillus MRSC medium or phosphate-buffered saline according to the same schedule. Clinical symptoms such as diarrhoea, rectal bleeding and loss in body weight were evaluated daily. Cytokine secretion (IL-6, IL-10 and TNF- α) was determined in supernatants of 48 h cultivated splenocytes, mesenteric lymph node lymphocytes and colon pieces by ELISA. The impairment of *colon descendens* was evaluated histologically. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P administrated mice remained healthy without signs of the intestinal inflammation. We did not find the shortening of *colon* (a sign of inflamed intestine) in lactobacillus-treated mice. We observed that administration of probiotic bacteria decreased levels of proinflammatory cytokines TNF- α and IL-6 in cultivated pieces of *colon descendens*.

We conclude that *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P administrated intragastrically protected mice against severe intestinal inflammation in experimental model of acute colitis and that this bacterium has probiotic properties.

Obsah

0 Zkratky	9
1 Úvod	11
2 Teoretická část	12
2.1 Střevní mikroflóra.....	12
2.1.1 Složení střevní mikroflóry.....	12
2.1.2 Význam střevní mikroflóry pro hostitele.....	13
2.2 Zánětlivé onemocnění střeva.....	14
2.2.1 Crohnova choroba.....	15
2.2.2 Ulcerózní kolitida.....	16
2.2.3 Pouchitida.....	17
2.2.4 Genetické faktory.....	17
2.2.5 Imunologické faktory.....	18
2.2.6 Faktory prostředí.....	20
2.2.7 Střevní mikroflóra a zánětlivé onemocnění střeva.....	21
2.2.8 Léčba zánětlivého onemocnění střeva.....	21
2.3 Probiotika.....	23
2.3.1 Vlastnosti probiotik.....	23
2.3.2 Probiotické mikroorganismy.....	24
2.3.2.1 Bakterie rodu <i>Lactobacillus</i>	25
2.3.3 Terapeutický účinek probiotik.....	26
2.3.4 Probiotické výrobky.....	29
2.3.5 Bezpečnost probiotik.....	30
2.4 Prebiotika a synbiotika.....	30
2.4.1 Prebiotika.....	30
2.4.2 Synbiotika.....	31
2.5 Experimentální modely kolitidy.....	31
2.5.1 Kolitida vyvolaná podáváním dextranulfátu sodného.....	33
2.5.2 Kolitida vyvolaná podáváním 2,4,6-trinitrobenzensulfonové kyseliny.....	34
2.5.3 Kolitida vyvolaná podáváním oxazolonu.....	35
2.6 Cytokiny stanovené při zánětlivém onemocnění střeva.....	35

2.6.1	Tumor nekrotizující faktor- α	36
2.6.2	Interleukin-6	36
2.6.3	Interleukin-10	37
2.6.4	Další cytokiny, jejichž stanovení je významné při zánětlivém onemocnění střeva	37
3	Experimentální část	39
3.1	Materiál	39
3.1.1	Bakterie	39
3.1.2	Myši	39
3.1.3	Média, roztoky a činidla	39
3.1.4	Pomůcky	43
3.1.5	Přístroje	44
3.2	Pracovní postup	45
3.2.1	Obnova lyofilizované bakterie a její kultivace	45
3.2.2	Stanovení růstové křivky bakterie	45
3.2.3	Příprava bakteriální suspenze pro sondování	46
3.2.4	Inaktivace bakterie	46
3.2.5	Schéma experimentu	46
3.2.6	Ukončení experimentu	48
3.2.7	Kultivace slezinných buněk a buněk mezenterálních lymfatických uzlin	49
3.2.8	Kultivace střevních kousků	50
3.2.9	Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA)	51
3.2.9.1	Stanovení cytokinů metodou ELISA	52
3.2.10	Histologické hodnocení zánětlivých změn tlustého střeva	54
3.2.10.1	Hodnocení stupně poškození tlustého střeva	56
3.2.10.2	Stanovení produkce mucinu v epiteliích	57
3.3	Vyjádření výsledků	58
4	Výsledky	60
4.1	Růstová křivka bakterie	60
4.2	Klinické nálezy	62

4.3 Stanovení cytokinů v supernatantech po kultivaci slezinných buněk a buněk mezenterálních lymfatických uzlin	65
4.4 Stanovení cytokinů v supernatantech po kultivaci střevních kousků	70
4.5 Histologické hodnocení zánětlivých změn tlustého střeva.....	75
5 Diskuze	81
6 Závěr	86
7 Literatura	88
7.1 Zdroje obrázků.....	95

Zkratky

A	absorbance
APC	Antigen Presenting Cell, buňka předkládající antigen
BB	Block Buffer, blokovací roztok
BSA	bovinní sérový albumin
CD	Crohn's Disease, Crohnova choroba
cfu	Colony Forming Unit, jednotka tvořící kolonii
DSS	dextranulfát sodný
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ELISA	Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay
FOS	fruktooligosacharid
GF	germ-free, bezmikrobní
GIT	gastrointestinální trakt
GOS	galaktooligosacharid
H&E	hematoxylin-eozin
HEPES	N-[2-hydroxyethyl] piperazin-N'-[2-ethansulfonová kyselina]
HRP	Horse Radish Peroxidase, křenová peroxidáza
IBD	Inflammatory Bowel Disease, zánětlivé onemocnění střeva
IFN	interferon
i. g.	intrastrická aplikace
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
LAB	Lactic Acid Bacteria, bakterie mléčného kvašení
MLU	mezenterální lymfatické uzliny
MRS	de Man-Rogosa-Sharpe
m. w.	molecular weight, molekulová hmotnost
NK	Natural Killer
PBS	Phosphate-Buffered Saline, fosfátový pufr
RD	Reagent Diluent, ředící roztok
RT	Room Temperature, pokojová teplota
SCFAs	Short Chain Fatty Acids, mastné kyseliny s krátkými řetězci
SCID	Severe Combined Immunodeficiency, těžký kombinovaný imunodefekt

SEM	Standard Error of the Mean, standardní chyba průměru
subsp.	subspecies
TCR	T Cell Receptor, receptor T lymfocytů
TGF	Transforming Growth Factor, transformující růstový faktor
Th	helper T lymphocyte, pomocný T lymfocyt
TLR	Toll Like Receptor
TMB	tetramethylbenzidin
TNBS	2,4,6-trinitrobenzensulfonová kyselina
TNF	Tumour Necrosis Factor, tumor nekrotizující faktor
UC	Ulcerative Colitis, ulcerózní kolitida
WB	Wash Buffer, promývací roztok

1 Úvod

Zánětlivá onemocnění střeva (Inflammatory Bowel Diseases, IBD), ulcerózní kolitida a Crohnova choroba, patří mezi chronická střevní onemocnění neznámé etiologie. Při jejich vzniku hrají roli genetické dispozice, životní prostředí, dietní návyky, nadužívání léků (zejména antibiotik) a stres. Všechny tyto faktory ovlivňují nerovnovážné složení střevní mikrobioty, která způsobuje dysregulaci slizniční imunitní odpovědi, která je pak za vznik choroby zodpovědná. Navození správné mikrobiální rovnováhy ve střevě podáváním vhodných bakterií s ochranným účinkem, tzv. probiotik, by mohlo být cestou, jak tyto choroby, které často vedou až k nádorovým stavům, léčit anebo jak jim předcházet.

Cílem diplomové práce bylo experimentálně ověřit, zda má vybraná bakterie *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P probiotické účinky, které by zabránily anebo zmírnily vývoj střevního zánětu u myší. Bakterie *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P jsme myším aplikovali intragastricky gumovou sondičkou, a to týden před navozením kolitidy a během ní. Akutní kolitidu jsme myším vyvolali roztokem dextransulfátu sodného, který během pokusu myši dostávaly místo pitné vody. Kontrolním myším laktobacily aplikovány nebyly. Během pokusu jsme sledovali klinické příznaky kolitidy, jako je průjem, krvácení z rektu a úbytek hmotnosti myší. Následně jsme vyhodnocovali změny ve struktuře střeva histologickými technikami. Metodou ELISA jsme stanovovali hladiny zánětlivých a protizánětlivých cytokinů v supernatantech po kultivaci slezinných lymfocytů, buněk mezenterálních lymfatických uzlin a kousků tlustého střeva (*colon descendens*).

Tato studie se uskutečnila v rámci plnění grantového projektu 2B06053 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy „Nové postupy při charakterizaci a identifikaci probiotických kmenů bakterií vhodných pro funkční potraviny“, řešeném v Laboratoři fyziologie, imunity a ontogeneze gnotobiontů Sektoru imunologie a gnotobiologie Mikrobiologického ústavu AV ČR, v.v.i. v Novém Hrádku.

2 Teoretická část

2.1 Střevní mikroflóra

2.1.1 Složení střevní mikroflóry

Střevo dospělého člověka obsahuje více než 400 mikrobiálních kmenů v celkovém počtu přibližně 10^{14} prokaryotických organismů, což je desetkrát více než všech eukaryotických buněk lidského těla. Klasické kultivační metody umožňují identifikovat pouze 20-40 % mikroorganismů střevní flóry. Využití metod molekulární mikrobiologie (např. analýza bakteriální 16S rRNA) značně rozšířilo znalosti o jejím složení (Madsen, 2001; Frič, 2005).

Bakterie vstupují ústní dutinou do těla a jsou spolu se slinami spolknuty do žaludku. Většinu takto přijatých bakterií zničí žaludeční kyselina. Protože pouze ty nejodolnější bakterie přežijí průchod žaludkem, nacházíme v horních úsecích tenkého střeva velmi malou bakteriální populaci. K nízkému počtu bakterií v tenkém střevě též přispívají žlučové kyseliny, bikarbonáty, laktozym, mucin a antimikrobiální peptidy. V tlustém střevě se naopak nachází bohatá bakteriální flóra (Gomes a Malcata, 1999).

V tenkém střevě směrem od duodena k rektu postupně stoupá počet bakterií. Zatímco v duodenu nacházíme přibližně 10^2 cfu/g (Colony Forming Unit, cfu) střevního obsahu, v jejunu 10^4 cfu/g, v distální části ilea je počet bakterií 10^7 cfu/g. Tenké střevo osídlují převážně gramnegativní aerobní bakterie a menší množství obligátních anaerobů. Anaerobní bakterie převažují v tlustém střevě, kde jejich počet dosahuje 10^{12} cfu/g stolice (Andoh a Fujiyama, 2006; Mach, 2006).

Mikroflóru v tlustém střevě tvoří zástupci rodů *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Peptostreptococcus*, *Bacillus*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Clostridium*, *Enterococcus* a *Enterobacter* (Madsen, 2001). Složení střevní mikroflóry v dospělosti je ovlivněno zejména stravovacími návyky, užíváním léků (zejména antibiotik), životním prostředím hostitele a psychickým stresem. Mezi střevní bakterie patří jednak "domácí" druhy, tzv. komezální bakterie, které trvale kolonizují zažívací trakt, a měnící se skupina mikroorganismů, která pouze dočasně prochází gastrointestinálním traktem (GIT) (Gomes a Malcata, 1999).

Dítě se prvními bakteriemi kolonizuje při porodu a získává trvale kolonizující bakterie během prvního roku života. (Jeho zažívací trakt je před porodem sterilní.) Střevní bakteriální kolonizaci ovlivňuje způsob porodu, úroveň hygieny a medikace. Při normálním spontánním porodu je novorozenec vystaven bakteriím z matčiny vaginální a střevní flóry, které jej přirozeně kolonizují. U dětí porozených císařským řezem bývají novorozenci nejprve kolonizováni mikroflórou porodního sálu. U novorozenců, kteří jsou výlučně kojeni, je střevní flóra složena z laktobacilů a bifidobakterií. U dětí nekojených se vyvíjí pestřejší flóra, která obsahuje vedle bifidobakterií také bakteroidy, enterobakterie, enterokoky a klostridie (Nevoral, 2005; Andoh a Fujiyama, 2006; Ewaschuk a Dieleman, 2006).

Rod *Bifidobacterium* je ve střevní flóře třetí nejpočetnější (tvoří 25 % všech mikrobů). Se stárnutím organismu klesá ve střevě počet bifidobakterií a dochází ke zmnožení kontaminujících bakterií, jako jsou klostridie a koliformní bakterie. K těmto změnám u starších lidí vede obvykle oslabená sekrece žaludeční kyseliny (Gomes a Malcata, 1999).

2.1.2 Význam střevní mikroflóry pro hostitele

Studie na bezmikrobních (germ-free, GF) zvířatech ukazují, že mikrobiální kolonizace není pro přežití organismu nezbytná. Kvůli absenci kolonizační rezistence jsou však GF zvířata náchylnější k infekcím než konvenční zvířata. Tento fakt potvrzuje, že mikrobiální kolonizace má důležitý zdravotní význam pro hostitelský organizmus (Sanders, 1999). Absence střevní mikroflóry u GF zvířat vede k signifikantním změnám ve struktuře a funkci střeva. Pozorujeme u nich tenčí a dlouhé klky, mělčí krypty, nižší počet leukocytů a rovněž počet a buněčnost Peyerských plátů je výrazně nižší (Ewaschuk a Dieleman, 2006).

Bakterie střevní mikroflóry žijí za normálních okolností v trvalé symbióze s eukaryotickými buňkami střevní sliznice. Bakterie střevní mikroflóry mají užitek z konstantního přísunu živin a stabilní teploty ve střevě. Hostitel naopak využívá schopnosti mikroflóry syntetizovat vitamín K, vyživovat epitelální buňky, tvořit mastné kyseliny s krátkými řetězci (Short Chain Fatty Acids, SCFAs), inhibovat růst patogenů, udržovat celistvost střevní bariéry a udržovat slizniční imunitní homeostázu (Ewaschuk a Dieleman, 2006).

Důležitým znakem střevní mikroflóry je neschopnost projít střevní epiteliální bariérou a aktivovat imunitní systém hostitele. Podstata tolerance slizničního imunitního systému ke střevní flóře nebyla dosud kompletně popsána a pochopena. Poruchy této tolerance však vedou ke zdraví škodlivým účinkům na hostitele (Ewaschuk a Dieleman, 2006). Střevní mikroflóra spolu s epiteliálními buňkami tvoří přirozenou bariéru proti invazi patogenních mikroorganismů. Pokud je celistvost této bariéry porušena (vlivem stresu, nemoci, terapie antibiotiky nebo dietních změn), může dojít k translokaci patogenních bakterií do krevního oběhu (Sanders, 1999).

Střevní mikroflóra je velmi důležitá pro vývoj slizničního imunitního systému (Cebra, 1999). V posledních desetiletích změněný způsob života, jeho chemizace a hygienická revoluce zlikvidovaly mnohé dětské infekce, které představují důležité stimuly pro správné dozrání imunitního systému. Tento vývoj, spolu s aplikací antibiotik a zvýšeným psychickým stresem, zásadně změnil složení střevní mikroflóry. Střevní mikroflóra ztratila svou po staletí udržovanou zdraví prospěšnou rovnováhu mezi jejími nepatogenními a patogenními bakteriálními složkami. Převahu v ní získaly různé hnilobné bakteriální kmeny, které místo vitamínů a jiných prospěšných látek produkují amoniak a sirovodík a další jedovaté látky, které chronicky intoxikují hostitele (Andoh a Fujiyama, 2006).

2.2 Zánětlivé onemocnění střeva

Zánětlivé onemocnění střeva (Inflammatory Bowel Disease, IBD) je souhrnný název pro idiopatické střevní záněty, mezi které patří ulcerózní kolitida (Ulcerative Colitis, UC) a Crohnova choroba (Crohn's Disease, CD). CD a UC jsou civilizační choroby vyskytující se častěji v industrializovaných zemích. Jejich výskyt se značně zvýšil zejména v posledních 50 letech, což naznačuje účast nových zatím neznámých faktorů prostředí na rozvoji těchto chorob. Obě nemoci mají nejspíše autoimunitní základ rozvíjející se na genetickém pozadí (Buc, 2004). IBD má obtížně předvídatelný průběh, ve kterém se střídají období zhoršení (relapsů) s fázemi relativního klidu (remisemi) (Lukáš, 2007). IBD je celoživotní nemoc, která významně snižuje kvalitu života (Geier et al., 2007). Pacienti s IBD trpí také na mimostřevní projevy nemoci, jako je postižení kůže,

kloubů a očí (Lukáš, 2007). Závažnou skutečností je fakt, že pacienti s tímto onemocněním, zejména UC, jsou ohroženi rozvojem kolorektálního karcinomu (Geier et al., 2007).

Charakteristickým rysem IBD je, že postihuje především mladé lidi. Typický věk v době diagnózy je 25-30 let (Lukáš, 2007). Druhý vrchol výskytu choroby nastává mezi 55 a 80 lety (Jonkers a Stockbrügger, 2003). Odhaduje se, že nemoc postihuje asi 0,5 % populace v ekonomicky vyspělých zemích světa. Můžeme předpokládat, že v České republice je cca 20 000-30 000 pacientů s IBD (Lukáš, 2007).

Pokud selhává konzervativní léčba nemoci, přistupuje se k léčbě chirurgické. Nejnovější metodou, která se v současné době zdá nejvýhodnější pro většinu pacientů, je tzv. rekonstruktivní proktokolektomie. Jedná se o ileoanální anastomózu (spojení) s uměle vytvořeným rezervoárem neboli pouchem. Pouch je vytvořen z kliček terminálního ilea a funkčně nahrazuje rektum. Nejběžnější komplikací tohoto chirurgického zákroku je tzv. pouchitida, což je nespecifický chronický zánět uvnitř vytvořeného rezervoáru. Pouchitida je relativně nové, ale časté onemocnění. Je řazena také do skupiny IBD (Šroubková a Hrubant, 2003; Mach, 2006). Podíl chirurgické léčby je u obou nemocí velmi odlišný. Přibližně 15-20 % nemocných s UC si vyžádá chirurgickou léčbu, naproti tomu až 70 % pacientů s CD je v průběhu života operováno (Lukáš, 2007).

Ačkoli CD a UC mají společné některé imunitní efektorové cesty, jsou tyto dvě nemoci imunologicky a histopatologicky odlišné (Wirtz a Neurath, 2007).

2.2.1 Crohnova choroba

Při CD se zánět může vyskytovat ve kterékoli části GIT a může se rozšířit po celé střešní stěně, čili od mukózy až po serózu. Na rozdíl od UC jsou léze diskontinuální. CD je charakteristická přítomností segmentů s normální sliznicí, které se nachází mezi postiženými regiony. Postižené bývá zejména terminální ileum, *coecum* a *colon*. Hlavními příznaky CD jsou průjem, bolesti břicha a hubnutí. Komplikací CD je zužování lumen střeva vedoucí až k jeho obstrukci. Dále dochází k tvorbě abscesů a fistul, což může vést k rozšíření zánětu na jiné orgány a břišní stěnu. CD se častěji vyskytuje u žen než u mužů (Bouma

a Strober, 2003; Junkers a Stockbrügger, 2003; Buc; 2004). Endoskopické nálezy v tlustém střevě při CD jsou uvedeny na obrázku 1.



Obrázek 1 – Endoskopické nálezy v tlustém střevě při Crohnově chorobě

A) mírný zánět, **B)** středně vážný zánět, **C)** vážný zánět

(<http://www.endowsec.com/pated/eicnclcd.htm>)

2.2.2 Ulcerózní kolitida

UC je hemoragicko-katarální zánět postihující na rozdíl od CD pouze mukózu a submukózu tlustého střeva. Zánět běžně propuká v rektu, odkud se šíří proximálně. Tlusté střevo může být postiženo v celém rozsahu. Hlavním příznakem UC je průjem, který bývá doprovázen rektálním krvácením. Komplikací choroby je progresivní ztráta peristaltické funkce střeva, která může ve vážných případech vést k toxickému *megacolon* a perforacím střeva. UC se rovnoměrně vyskytuje u obou pohlaví (Bouma a Strober, 2003; Jonkers a Stockbrügger, 2003; Geiger et al., 2007). Endoskopické nálezy v tlustém střevě při UC jsou uvedeny na obrázku 2.



Obrázek 2 – Endoskopické nálezy v tlustém střevě při ulcerózní kolitidě

A) mírný zánět, **B)** středně vážný zánět, **C)** vážný zánět

(<http://www.endowsec.com/pated/eicncluc.htm>)

2.2.3 Pouchitida

Pouchitida se vyvíjí u 7-45 % pacientů s ileálním pouchem a je častější u pacientů s UC (Junkers a Stockbrügger, 2003). Etiologie a patogeneze pouchitidy je neznámá. Hlavní roli při vzniku choroby hraje zřejmě snížení počtu bifidobakterií a laktobacilů ve střevní mikroflóře a přemnožení patogenně působících bakterií (Mach, 2006). Pro pouchitidu je charakteristické zvýšené množství žlučových solí a snížené množství SCFAs ve střevě s následným zvýšením pH stolice (Jonkers a Stockbrügger, 2003).

2.2.4 Genetické faktory

Přestože dodnes neznáme přesnou etiologii těchto chorob, můžeme říci, že při rozvoji IBD hrají významnou roli faktory genetické, imunologické a faktory prostředí. Zásadní faktor pro rozvoj IBD je neregulovaná imunitní odpověď geneticky predisponovaného jedince vůči vlastní střevní mikroflóře. Nedávné studie prokázaly, že se genetické faktory více uplatňují při rozvoji CD než UC (Geier et al., 2007). Popisován je dědičný výskyt a vysoká konkordance CD u monozygotních dvojčat (Matulka, 2001).

Jedním z nejdůležitějších genů pro vznik CD je NOD-2 gen umístěný na chromozomu 16 (tzv. IBD1 lokus). NOD proteiny, produkty NOD genů, patří k tzv. vzorkovým receptorům (Pattern Recognition Receptors), které rozpoznávají bakteriální komponenty. Na rozdíl od typických představitelů vzorkových receptorů, Toll Like Receptors (TLR), se nevyskytují v membránách buněk, ale v jejich cytoplazmě. NOD-2 proteiny rozpoznávají peptidoglykany

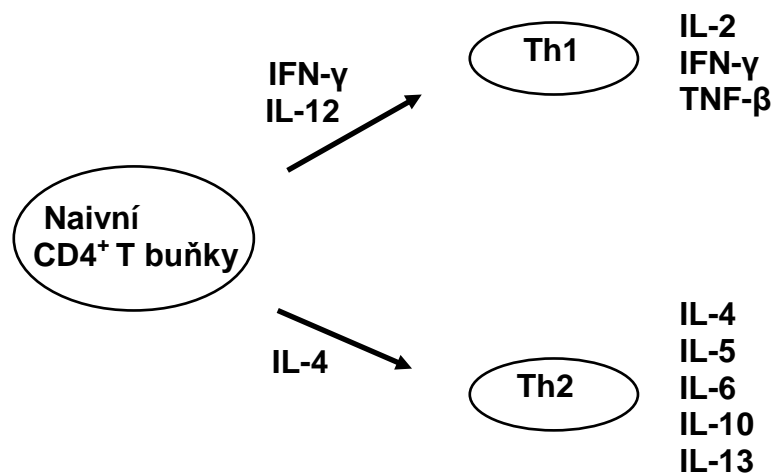
obsahující muramyldipeptid, který se nachází ve stěně prakticky všech grampozitivních bakterií. NOD receptory se nachází v makrofázích a různých epitelových buňkách, obzvláště významná je jejich přítomnost v epitelích střeva. Peptidoglykany bez ohledu na to, zda obsahují muramyldipeptid, jsou rozpoznávány také prostřednictvím TLR-2. Peptidoglykany indukovaná signalizace přes TLR-2 vede k produkci IL-12 a tím k polarizaci imunitní odpovědi do Th1 směru. Signalizace přes NOD-2 inhibuje signalizaci přes TLR-2. Při CD dochází v důsledku mutace genu NOD-2 k výpadku negativní kontroly aktivity TLR-2 a tím přemrštěné aktivaci Th1 imunitní odpovědi, která je typická pro imunopatogenezi CD. Homozygoti s mutací v NOD-2 mají 20-40krát větší pravděpodobnost rozvoje CD oproti jedincům bez mutace. Při heterozygotní mutaci je riziko 2-4násobné. Mutace v NOD-2 genu je přítomná přibližně u 20 % pacientů s CD (Jonkers a Stockbrügger, 2003; Buc, 2004). Tato mutace se nevyskytuje u nemocných s UC (Matulka, 2001).

2.2.5 Imunologické faktory

Jak už bylo zmíněno, v patogenezi IBD hraje roli zvýšená imunitní odpověď hostitele vůči vlastní střevní mikroflóře (Geier et al., 2007). Nepatogenní složky normální mikroflóry (laktobacily, bifidobakterie) jsou vytlačeny potenciálně patogenními bakteriemi. Abnormální interakce mezi slizničním imunitním systémem a narušenou střevní mikroflórou vede k odlišné imunitní odpovědi, která spouští zánětlivý proces. Ve zdravém střevě mononukleární buňky *lamina propria* tolerují střevní flóru, při střevním zánětu, zejména UC, je tato tolerance porušená (Bai et al., 2006; Geier et al., 2007).

Imunitní dysfunkce u pacientů s IBD spočívá v odchylné sekreci zánětlivých cytokinů a chemokinů, které vylučují imunitní buňky střevní sliznice a epitelu. Nacházíme zvýšenou aktivitu efektorových lymfocytů, nedostatečnou aktivitu regulačních lymfocytů, rezistenci T lymfocytů k apoptóze, chybnou funkci buněk předkládajících antigen (Antigen Presenting Cell, APC) a sníženou hladinu protizánětlivých cytokinů (Ewaschuk a Dieleman, 2006; Geier et al., 2007). U pacientů s CD byla zjištěna zvýšená produkce imunoglobulinu G (IgG) s relativním nedostatkem slizničního IgA, u pacientů s UC se spíše předpokládá vznik autoimunitní reakce vůči epiteliálním buňkám střeva (Jonkers a Stockbrügger, 2003).

Za normálních okolností jsou střevní antigeny zpracovány makrofágy či APC a následně rozpoznány $CD4^+$ T buňkami. $CD4^+$ T buňky se rozdělují do dvou podskupin na základě profilu cytokinové produkce na Th1 a Th2 lymfocyty (Jonkers a Stockbrügger, 2003). O tom, budou-li se naivní $CD4^+$ T buňky vyvíjet směrem k Th2 nebo Th1 typu, rozhoduje poměr koncentrací dvou cytokinů - interleukinu-12 (IL-12) a IL-4. IL-12 je produkován makrofágy a dendritickými buňkami, IL-4 hlavně bazofily a mastocyty. Podstatné je, že cytokiny produkované Th1 buňkami (hlavně interferon- γ , IFN- γ) dále podporují vývoj Th1 a silně inhibují vývoj Th2. Naopak IL-4 a IL-10 podporují vznik Th2 a inhibují vývoj Th1. Započne-li tedy Th1 odpověď, bude mít silnou tendenci automaticky se stabilizovat a potlačovat konkurenční Th2 odpověď a naopak. To je jeden z nejdůležitějších imunoregulačních mechanismů. Nesprávně zvolená odpověď může mít fatální následky (Hořejší a Bartůňková, 2001). Schéma diferenciacie Th lymfocytů ilustruje obrázek 3.



Obrázek 3 - Schéma diferenciacie Th lymfocytů (McGeady, 2004)

Imunitní odpověď je při CD řízena převážně Th1 lymfocyty, během níž pozorujeme nejprve zvýšenou hladinu IL-2 následovanou zvýšenou expresí IFN- γ . Převaha Th1 řízené imunitní odpovědi u pacientů s CD byla potvrzena také studiemi, které odhalily zvýšenou slizniční expresi IL-12, který je klíčovým faktorem pro diferenciaci T lymfocytů při buněčné imunitní odpovědi na zánět (Geiger et al., 2007; Wirtz a Neurath, 2007). Základní funkcí Th1 buněk je

spolupráce s makrofágy a jejich stimulace k přeměně na aktivované makrofágy. Th1 buňkami sekretovaný cytokin IFN- γ stimuluje makrofágy na aktivovanou formu. Ty následně produkují IL-1 a tumor nekrotizující faktor- α (TNF- α) a tím přispívají k další stimulaci T buněk a podporují lokální zánět (Hořejší a Bartůňková, 2001).

Chronický zánět u pacientů s UC je řízen Th2 imunitní odpovědí, která je spojená s dysfunkcí epitelu. Imunitní odpověď řízená Th2 lymfocyty vede ke zvýšené produkci IL-4, IL-5, IL-6 a IL-10. Významnou roli při spuštění UC hrají také cytokiny TNF- α a IL-1 (Zhang et al., 2006; Wirtz a Neurath, 2007). Základní funkcí Th2 buněk je působení v oblasti humorální imunity. Th2 buňky spolupracují s B lymfocyty, které byly předem stimulovány rozeznáním antigenu. Pomoc Th2 buněk B lymfocytům je založena na sekreci výše zmíněných cytokinů a jejich přímém mezibuněčném kontaktu (Hořejší a Bartůňková, 2001; Matulka, 2001).

2.2.6 Faktory prostředí

IBD se častěji vyskytuje v rozvinutých zemích se západním stylem života. Vyšší úroveň hygieny a vyšší životní standard zvyšují riziko rozvoje IBD (Geier et al., 2007). IBD se častěji vyskytuje u lidí s dobrou nebo vyšší socioekonomickou úrovní, s náročným zaměstnáním a častými stresy. Ženy užívající hormonální kontraceptiva mají vyšší incidenci IBD než ženy, které hormonální antikoncepci neužívaly (Matulka, 2001).

Obyvatelé žijící ve vyspělých státech nejsou v dětství přirozeně imunizováni mírně patogenními bakteriemi zemědělského prostředí, které jsou schopné stimulovat vývoj nepatologické imunitní odpovědi a přispívat k navození tolerance k faktorům vnějšího prostředí. Vysoká hygiena a sterilita mnohých potravin tak paradoxně neprospívá správnému vývoji imunitní odpovědi zejména dětí a vede k neadekvátní imunitní odpovědi jejich organismu v dospělosti (Geier et al., 2007).

K zemím s nejvyšším výskytem patří Švédsko, Velká Británie a severní oblasti USA. Střední výskyt je v oblasti Středomoří, východní Evropy, Austrálie a Nového Zélandu. Naopak nejnižší výskyt onemocnění je pozorován v Asii a Africe. Vyšší incidence IBD je dále pozorována ve městech ve srovnání s vesnicemi (Karlinger, 2000; Matulka, 2001).

2.2.7 Střevní mikroflóra a zánětlivé onemocnění střeva

Při IBD se zánětlivé léze a poškození vyskytují hlavně v úsecích střeva s nejvyšší koncentrací bakterií, jako je ileum a tlusté střevo, což podporuje hypotézu, že střevní bakterie hrají významnou roli při vzniku tohoto onemocnění. (Geier et al., 2007). Z tohoto důvodu se v léčbě IBD ujal užívání širokospektrých antibiotik (Ewaschuk a Dieleman, 2006). Chirurgický odklon toku stolice postiženým střevem zmírní zánět a vede k hojení sliznice ve vyřazeném střevním segmentu, avšak znovuoobnovení průchodu stolice vede k rychlé recidivě choroby (Andoh a Fujiyama, 2006).

Další důkaz pro významnou roli střevních bakterií při rozvoji IBD nám poskytují zvířecí modely, u kterých byl zánět střeva navozován za GF podmínek. U experimentálních zvířat chovaných v GF podmínkách není možné vyvinout akutní střevní zánět, zatímco po kolonizaci komenzálními bakteriemi se u nich zánět vyvine spontánně (Hudcovic et al., 2001; Geier et al., 2007; Ewaschuk a Dieleman, 2006; Wirtz a Neurath, 2007).

Střevní mikroflóra pacientů s CD obsahuje větší množství anaerobních bakterií, mimo jiné zástupce rodu *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus* a *Coprococcus* (Štěpánková et al., 2007). Bakteriální dysbióza a přemnožení hrají roli také při rozvoji chronické pouchitidy (Ewaschuk a Dieleman, 2006).

2.2.8 Léčba zánětlivého onemocnění střeva

Základní cíl terapeutického snažení je dosažení remise nemoci, její dlouhodobé udržení, zabránění vzniku komplikací a zlepšení kvality života pacientů (Lukáš, 2007). Léčba IBD v posledních letech doznala výrazných úspěchů ve snížení mortality, méně však dokáže zlepšit dlouhodobý chronický průběh onemocnění a zabránit recidivám (Matulka, 2001).

V počátcích choroby se pacientům podává sulfasalazin a 5-aminosalicylová kyselina (resp. její deriváty mesalazin či olsalazin). Ve středním stupni rozvoji choroby se podávají glukokortikoidy (prednison, prednisolon, hydrokortison, budesonid) a v nejpokročilejším stádiu imunosupresiva (cyklosporin A, tacrolimus, azathioprin, merkaptopurin, methotrexát). Nedílnou součástí základní terapie pacientů s CD, zejména

pacientů dětských, je nutriční terapie. V případě, že medikamentózní terapie selhává, doporučuje se chirurgický zákrok (Matulka, 2001; Buc, 2004).

Výše zmíněné léky mají mnohé nežádoucí účinky, kterými pacienta poškozují. Zejména senioři reagují citlivě na vedlejší nežádoucí účinky medikamentózní terapie (Lukáš, 2007). Např. léčba antibiotiky je spojená s jejich nespecifickým účinkem na střevní flóru s možností navození antibiotické rezistence a vzniku superinfekce bakterií *Clostridium difficile* (Andoh a Fujiyama, 2006). Vzhledem k tomu, že střevní mikroflóra hraje důležitou roli v patogenezi IBD, představuje modulace střevního obsahu podáváním probiotik a prebiotik novou cestu k léčení i profylaxi IBD. Na začátku třetího milénia se začíná hovořit o končící éře antibiotik a začínající éře probiotik, stejně tak o nové biotechnologicko-medicínské specializaci – probiotické medicíně (Ferenčík a Ebringer, 2003; Mach, 2006). Zatímco antibiotika eliminují agresivní mikrobiální kmeny při akutních zánětlivých projevech a komplikacích IBD, probiotika příznivě ovlivňují různými mechanismy porušenou rovnováhu jednotlivých složek gastrointestinálního ekosystému (Frič, 2005).

V poslední době se začalo také s biologickou terapií. Protože při IBD významnou roli sehrává prozánětlivý cytokin TNF- α , začalo se s léčbou, která neutralizuje jeho biologickou aktivitu. K dispozici jsou chimérové anti-TNF- α monoklonální protilátky (infliximab) a plně humánní monoklonální protilátky (adalimumab). Výborné výsledky se uvádějí u podávání monoklonálních protilátek proti IL-12 a proti receptoru pro IL-6. Zkouší se i podávání protizánětlivých cytokinů, buď samotného IL-10, nebo v kombinaci s IL-4. Oba cytokiny jsou ve formě lipozomů a podávají se parenterálně (Buc, 2004; Rutgeerts et al., 2004).

Novou nadějí v léčbě IBD jsou geneticky modifikované organizmy, jako je např. transgenní *Lactococcus lactis*, který je schopný secernovat bioaktivní protizánětlivý cytokin IL-10 (Steidler et al., 2000; Hanniffy et al., 2004; Andoh a Fujiyama, 2006).

2.3 Probiotika

Zakladatelem učení o probiotických účincích byl ruský mikrobiolog Elie Metchnikoff (1845-1916), který vyslovil hypotézu, že je dlouhý a zdravý život bulharských rolníků a kavkazských pastevců spojen s konzumací kvašených mléčných výrobků. Předpokládal, že fermentující bakterie pozitivně ovlivňují mikrobiotu a snižují aktivitu škodlivých mikrobů (Metchnikoff, 1907; Sanders, 1999; Frič, 2005). Termín probiotikum pochází ze dvou řeckých slov, která znamenají “pro život“, a je v protikladu s termínem antibiotikum – “proti životu“ (Michalík et al., 1999).

Probiotika se definují jako látky nebo produkty obsahující v dostatečném množství životaschopné mikroorganismy, které po osídlení GIT působí zdravotně prospěšně na hostitele (Ferenčík a Ebringer, 2003). Nedávné studie potvrdily, že léčebný účinek mají nejenom živé bakterie, ale i teplem inaktivované či probiotické bakterie ozářené γ -paprsky, izolovaná bakteriální DNA a dokonce samotná média, ve kterých byly probiotické bakterie kultivovány (Mach, 2006).

Probiotika nepůsobí bakteriostaticky či baktericidně, ale vyvolávají zdravotně prospěšné účinky tím, že se podílejí na procesech imunitní regulace (Ferenčík a Ebringer, 2003). Klinické studie potvrdily, že jsou probiotika schopná u pacientů s UC dosáhnout remise a udržet ji, předcházet postchirurgické recidivě CD a udržovat remisi u pacientů s pouchitidou (Mach, 2006). Mach (2006) nicméně uvádí, že jsou probiotika méně účinná u pacientů s CD ve srovnání s účinky na pouchitidu a UC. Ewaschuk a Dieleman (2006) uvádějí, že jsou některá probiotika schopná léčit mírné a středně závažné záněty. Vědecké studie potvrdily, že konzumace probiotik ve vysokých koncentracích (10^9 - 10^{11} /den) snižuje incidenci, trvání a závažnost některých střevních onemocnění (Sanders, 1999).

2.3.1 Vlastnosti probiotik

Pro orálně podávaná probiotika je důležité, aby v nich obsažené bakterie byly schopné přežít průchod z ústní dutiny do tlustého střeva. Proto musí být probiotické bakteriální kmeny jak acidorezistentní, tak odolné vůči žlučovým kyselinám (Madsen, 2001). Odolnost bakterií je významná také pro zachování životaschopnosti během transportu a skladování probiotického výrobku. Gomes

a Malcata (1999) uvádějí, že by probiotické bakterie měly být schopné přežít prostředí v žaludku (pH 1,5-2 nalačno a pH 4-5 po jídle). Druhou důležitou vlastností probiotik je schopnost adheze ke střevní sliznici, která je nezbytná pro dočasnou kolonizaci GIT. Třetí důležitý znak probiotik je schopnost inhibice růstu patogenů ve střevě. Probiotické bakterie produkují antimikrobiální substance - tzv. bakteriociny, mezi které patří bakteriostatické a baktericidní peptidy typu mikrocinů a kolicinů (Frič, 2005; Mach, 2006). Probiotické bakterie inhibují růst patogenů také tím, že produkují kyselinu mléčnou a octovou, které snižují pH ve střevě (Mach, 2006).

Předpokladem pro označení určitého mikroorganismu jako probiotického je prokázaná účinnost a bezpečnost za doporučených podmínek a použití pro definovanou zdravotní situaci, metodu aplikace a dávkování (Frič, 2005). Probiotické bakteriální kmeny by měly být izolované ze stejného živočišného druhu, jako je potenciální příjemce. Nesmí být toxické ani patogenní (Nevoral, 2005; Mach, 2006). Probiotika určená k podávání lidem by měla být lidského původu, i když skupina Dr. Lodinové-Žádníkové podávala novorozencům dětem nepatogenní bakterii *E. coli* O83 (nyní v prodeji jako Colinfant), která je prasečího původu, a děti i po dvaceti letech po podávání měly menší výskyt alergií a nozokomiálních infekcí (Lodinová-Žádníková et al., 1998).

2.3.2 Probiotické mikroorganismy

Probiotické výrobky dostupné na našem trhu obsahují nejčastěji mikroorganismy, které patří do skupiny bakterií mléčného kvašení (Lactic Acid Bacteria, LAB). Řadíme mezi ně bakterie rodu *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a *Streptococcus* (Madsen, 2001; Mach, 2006). Probiotické výrobky mohou obsahovat také další nepatogenní bakterie, jako je *Escherichia coli* Nissle 1917, *Enterococcus faecium*, a kvasinku *Saccharomyces boulardii*. Ve vědecké literatuře jsou často zmiňovány účinky probiotického koktejlu VSL#3, který obsahuje hned několik kmenů živých lyofilizovaných bakterií, a to sice 4 druhy rodu *Lactobacillus* (*Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. acidophilus* a *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), 3 druhy rodu *Bifidobacterium* (*B. longum*, *B. breve* a *B. infantis*) a *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (Ewaschuk a Dieleman, 2006). Tabulka 1 uvádí přehled probiotických mikroorganismů.

Tabulka 1 - Přehled probiotických mikroorganismů (Madsen, 2001; Nevoral, 2005)

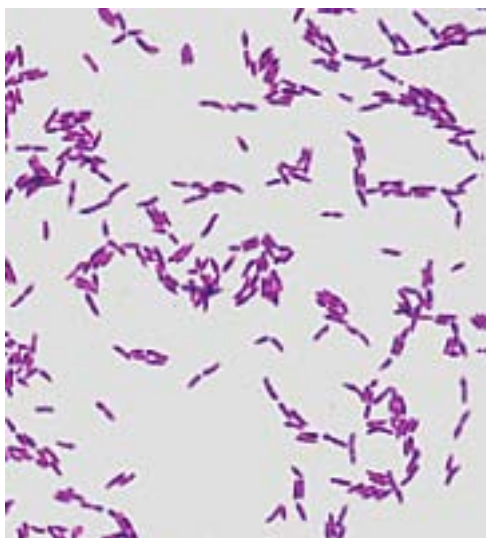
Bakterie rodu <i>Lactobacillus</i>	Bakterie rodu <i>Bifidobacterium</i>	Grampozitivní koky	Kvasinkové mikroorganismy
<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> (<i>Lactobacillus</i> GG), <i>Lb. casei</i> Shirota, <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lb. reuteri</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. cellobiosus</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. plantarum</i>	<i>B. bifidum</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. thermophilum</i> , <i>B. adolescentis</i> , <i>B. animalit</i>	<i>Streptococcus</i> <i>diacetylactis</i> , <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>Lactococcus</i> <i>lactis</i> subsp. <i>cremonis</i> , <i>Enterococcus</i> <i>faecium</i> , <i>Escherichia coli</i> (sérotyp O83:K24:H1)	<i>Saccharomyces</i> <i>boulardii</i> , <i>S. cerevisiae</i>

2.3.2.1 Bakterie rodu *Lactobacillus*

Laktobacily charakterizujeme jako grampozitivní, nesporulující a nepohyblivé tyčky (viz. obrázek 4). Podle produktů katabolického metabolismu rozdělujeme laktobacily na homofermentativní mléčné bakterie, které při zkvašování hexóz produkují výhradně kyselinu mléčnou (např. druhy *Lactobacillus delbrueckii*, *Lb. acidophilus*) a na heterofermentativní mléčné bakterie, které jsou schopné fermentovat hexózy i pentózy a produkovat kromě kyseliny mléčné také kyselinu octovou, ethanol a CO₂ (např. *Lactobacillus fermentum*, *Lb. buchneri*) (Šilhánková, 2002). Bakterie rodu *Lactobacillus* jsou fakultativně anaerobní, jejich růst na pevných médiích usnadňuje prostředí se sníženým tlakem kyslíku obohacené o 5-10 % CO₂. Optimální teplota pro růst je 35-40 °C, optimální pH mezi 5,5-6 (Gomes a Malcata, 1999).

Taxonomické zařazení bakterií rodu *Lactobacillus* je následující (Kandler a Weiss, 1986):

- doména: *Bacteria*
- kmen: *Firmicutes*
- třída: *Bacilli*
- řád: *Lactobacillales*
- čeleď: *Lactobacillaceae*
- rod: *Lactobacillus*



Obrázek 4 - *Lactobacillus acidophilus* (barveno dle Grama)
(<http://www.bact.wisc.edu/themicrobialworld/Normalflora.html>)

2.3.3 Terapeutický účinek probiotik

Terapeutický účinek probiotik je komplexní a dosud není plně objasněn, nicméně známe několik obecných mechanismů, kterými mohou působit. Probiotické bakterie soutěží s patogenními mikroorganismy o omezený počet receptorových míst na epiteliálním povrchu, čímž zabraňují patogenům střeva osídlit. Mechanismus působení probiotik zahrnuje zvýšení sekrece mucinu, který též zamezuje patogenům navázat se na epiteliální receptory. Předpokládá se, že probiotické kmeny mohou využívat živiny, které by jinak byly spotřebovány patogenními mikroorganismy. Některá probiotika mají schopnost

degradovat receptory pro toxiny na střevní sliznici. Jsou schopná zvyšovat proliferaci epitelálních buněk v tenkém střevě, slepém střevě a distálním úseku tlustého střeva. Dále jsou schopná stimulovat makrofágy, NK buňky (Natural Killer), lymfocyty, indukovat apoptózu T lymfocytů a zvýšit produkci slizničního IgA (Geier et al., 2007; Nevoral, 2005; Madsen, 2001). Fermentují polysacharidy a tím produkují SCFAs, které poskytují metabolickou energii pro epitelální buňky, zvyšují integritu střevní bariéry, chrání střevní sliznici před poškozením a podporují její hojení. Produkují antimikrobiální substance (peroxid vodíku, organické kyseliny, bakteriociny) a rozkládají patogenní antigeny. Inhibují tvorbu zánětlivých cytokinů, mezi které patří TNF- α , IFN- γ , IL-8, IL-12 a podporují vyplavování protizánětlivých cytokinů IL-10 a transformujícího růstového faktoru- β (Transforming Growth Factor- β , TGF- β) (Andoh a Fujiyama, 2006; Mach, 2006; Ewaschuk a Dieleman, 2006).

Probiotické bakterie jsou schopné vyvolat celou řadu léčebných účinků. Jejich přehled uvádí tabulka 2. Mezi ty nejvíce potvrzené a uznávané patří zmírnění příznaků laktóзовé intolerance, která je způsobena získaným nebo vzácně vrozeným deficitem enterocytární laktázy, a jejich účinek proti průjmům. Povzbuzující výsledky se objevují v oblasti protirakovinového a imunomodulačního účinku. Ovlivnění střevní mikroflóry a slizniční imunity patří mezi takové účinky probiotik, které mají velký potenciál ovlivnit celou fyziologii organismu (Sanders, 1999; Frič, 2005).

Co se týče protirakovinového účinku, zdá se, že probiotika působí proti mutagenním a genotoxickým vlivům v tlustém střevě a jiných orgánech a snižují proliferaci rakovinových buněk (Sanders, 1999; Frič, 2005). Střevní mikroflóra je schopna ovlivňovat tvorbu karcinomu produkcí enzymů, které mění ve střevě prekarcinogeny v karcinogeny. Tyto enzymy jsou β -glukuronidáza, azoreduktáza a nitroreduktáza. Některé mikroorganismy jsou však schopny chránit hostitele tím, že tyto enzymatické aktivity tlumí. *Lactobacillus casei* GG, *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium bifidum* významně snižují množství těchto enzymů ve stolici. Některé studie na zvířatech ukázaly schopnost probiotik inhibovat růst nádorových buněk, určité bakterie mají schopnost vázat se na případné karcinogeny. Nicméně přehled desítek epidemiologických studií neprokázal významný vliv fermentovaných potravin na incidenci karcinomů. Nutné jsou studie s definovaným typem probiotika (Nevoral, 2005).

Uvádí se, že laktobacily a bifidobakterie syntetizují kyselinu listovou, niacin, tiamin, riboflavin, pyridoxin a vitamín K. Tyto složky střevu pomalu vstřebává. Konzumace kvašených mléčných výrobků má také vliv na lepší vstřebávání minerálů, jako je kalcium, zinek, železo, mangan, měď a fosfor. Výrobky obsahující bifidobakterie a laktobacily usnadňují trávení bílkovin, sacharidů a tuků. Kolonizace bifidobakteriemi urychluje funkční vyžrávání enterocytů (Gomes a Malcata, 1999; Kozáková et al., 2001).

Tabulka 2 - Potenciální a potvrzené léčebné účinky probiotických bakterií (Sanders, 1999)

Léčebný účinek	Mechanismus účinku
Pomoc při trávení laktózy	Bakteriální laktáza hydrolyzuje laktózu
Rezistence ke střevním patogenům	Kolonizační rezistence; Změna podmínek ve střevě, podmínky méně výhodné pro patogeny (pH, SCFAs, bakteriociny); Modifikace vazebných míst pro toxiny; Ovlivnění střevní mikroflóry; Adheze ke střevní sliznici, narušení adheze patogenů; Zvýšení sekrece mucinu zamezuje vazbě patogenů na střevní epitelální buňky
Protirakovinový účinek v tlustém střevě	Vazba mutagenů; Deaktivace karcinogenů; Inhibice tvorby karcinogen-produkujících enzymů střevními mikroby; Ovlivnění koncentrace sekundárních žlučových solí
Přemnožení bakterií v tenkém střevě	Ovlivnění aktivity přemnožené flóry, snížení tvorby toxických metabolitů; Změna střevního prostředí, podmínky méně příznivé pro aktivitu přemnožené flóry
Modulace imunitního systému	Posílení nespecifické obrany proti infekci a tumorům;

	Pomocný účinek v antigen-specifické imunitní odpovědi; Zvýšení produkce IgA
Alergie	Prevence translokace antigenů do krevního oběhu
Krevní lipidy, srdeční choroby	Bakteriální buňky asimilují cholesterol; Zvýšené vylučování žlučových solí; Antioxidační účinek
Antihypertenzní účinek	Peptidáza vytváří z mléčných proteinů tripeptidy, které inhibují angiotenzin 1 konvertující enzym; Složky buněčné stěny fungují jako inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu
Urogenitální infekce	Adheze k buňkám močového a pohlavního ústrojí; Kolonizační rezistence
Infekce způsobené <i>Helicobacter pylori</i>	Produkce inhibitorů <i>H. pylori</i> (kyseliny mléčné a dalších)
Jaterní encefalopatie	Inhibice střevní flóry produkující ureázu

2.3.4 Probiotické výrobky

Tradiční probiotické mikroorganismy jsou přidávány do kvašených mléčných výrobků, jako jsou kefíry, jogurty, jogurtové nápoje, sýry apod. Tyto výrobky jsou schopné udržet bakterie po určitou dobu živé. Mléčný výrobek po požití pufruje žaludeční kyselinu, což zvyšuje stabilitu probiotických bakterií (Sanders, 1999). Na trhu jsou dostupné také probiotické tablety a kapsle v enterosolventním obalu, který bakterie chrání před poškozením žaludeční kyselinou (Madsen, 2001).

Pro praxi je nutné zdůraznit, že probiotika obsahující živé mikroorganismy je třeba uchovávat v chladničce při teplotě do 8 °C (Frič, 2005). Prodej výrobků s probiotickými bakteriemi má tradici hlavně v Japonsku a v Západní Evropě (Sanders, 1999).

2.3.5 Bezpečnost probiotik

Orální podávání probiotik je dobře tolerováno a je bezpečné. Díky nedostatku závažných vedlejších účinků nejsou probiotika u pacientů s IBD kontraindikována (Ewaschuk a Dieleman, 2006). Probiotická terapie má fyziologický charakter. Tato koncepce přináší nové terapeutické možnosti u řady chorob trávicího ústrojí a její význam se bude zvyšovat s přibývajícím poznatky a zkušenostmi (Frič, 2005). Studium léčebného použití probiotik však vyžaduje více randomizovaných dvojité slepých a placebem kontrolovaných studií (Nevoral, 2005).

Jsou zaznamenány pouze vzácné případy sepsí a endokarditid, které byly vyvolány laktobacily (Madsen, 2001). Tyto nežádoucí účinky se vyskytly pouze u imunodeficitních pacientů s aplazií, pacientů HIV pozitivních či po orgánové transplantaci. Ve většině případů nebylo zdrojem infekce použité probiotikum, ale pravděpodobně vlastní flóra. Také jsou zaznamenány případy fungémie po léčbě kvasinkou rodu *Saccharomyces*, což se týkalo opět imunodeficitních jedinců (Madsen, 2001).

2.4 Prebiotika a synbiotika

2.4.1 Prebiotika

Prebiotika jsou definována jako nestravitelné složky potravy, které selektivně stimulují růst a aktivitu jednoho či více druhů bakterií v tlustém střevě, čímž blahodárně působí na zdraví hostitele (Andoh a Fujiyama, 2006). Činnost střevní mikroflóry (včetně probiotických mikroorganismů) vyžaduje přítomnost nutričních substrátů – prebiotik. Látky, které působí prebioticky, nejsou stravitelné buněčnými enzymy trávicího ústrojí a nejsou absorbovány v horní části GIT. Prebiotika jsou štěpena až v tlustém střevě mikrobiálními enzymy za vzniku látek nezbytných pro metabolismus a funkci střevní sliznice (Spiegel, 1994; Madsen, 2001; Frič, 2005).

K prebiotikům řadíme zejména různé formy vlákniny (celulózu, pektiny, xylany), dále fruktooligosacharidy (FOS), mezi které patří inulin, galaktooligosacharidy (GOS), laktulózu a laktosacharózu. Strukturálně jsou prebiotika směsí polymerů a oligomerů, které se skládají z rozvětvených řetězců

složených z fruktózových jednotek. Oligosacharidy o nízké molekulové hmotnosti jsou obsaženy v cibuli, česneku, pórků, čekance, artyčokách, medu, rýži, ječmeni a pšenici (Spiegel, 1994; Madsen, 2001; Frič, 2005).

Prebiotika stimulují růst zdravích prospěšných bakterií rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* (Madsen, 2001; Frič, 2005). Příjem FOS (15 g/den) v kontrolované dietní studii desetkrát zvýšil počet střevních bifidobakterií, zatímco počty bakterií rodu *Clostridium* a *Enterobacter* byly sníženy (Madsen, 2001). Reakčními produkty štěpení prebiotik mikrobiálními enzymy jsou SCFAs, a to zejména butyrát, který představuje zdroj energie pro enterocyty, stimuluje produkci antibakteriálních látek a snižuje pH v lumen střeva (Frič, 2005; Andoh a Fujiyama, 2006; Ewaschuk a Dieleman, 2006; Geier et al., 2007). Dalšími produkty štěpení jsou některé aminokyseliny, polyaminy, růstové faktory, vitamíny a antioxidanty. Tyto látky se významně podílejí na výživě střevního epitelu a řadě dalších metabolických procesů. Předpokládá se, že účinná denní dávka prebiotika je 1-3 g u dětí a 10-15 g u dospělých (Frič, 2005).

2.4.2 Synbiotika

Synbiotikum je produkt, ve kterém nalezneme kombinaci jednoho nebo více druhů probiotik i prebiotik (Andoh a Fujiyama, 2006). Bakterie díky prebiotiku snadněji přežijí průchod horním úsekem GIT a snadněji se usadí v tlustém střevě (Madsen, 2001). V synbiotiku je probiotikum kombinováno s prebiotikem, které je pro něj specifické, např. FOS s rodem *Bifidobacterium* (Nevoral, 2005).

2.5 Experimentální modely kolitidy

Zvířecí modely kolitidy jsou nezbytné pro pochopení patogeneze CD a UC, neboť etiologie těchto chorob nebyla dosud plně objasněna. Díky studiu experimentálních modelů střevního zánětu bylo dosaženo významných pokroků v pochopení mechanismů slizniční imunity. Studium těchto modelů umožnilo odhalit některé imunoregulační procesy ve střevě a potvrdilo obecně přijímanou hypotézu, že v patofyziologii IBD hraje významnou roli odchylná imunitní odpověď vůči složkám střevní mikroflóry. Ačkoli experimentální zvířecí modely kolitidy nereprezentují komplexnost a složitost lidského IBD a nenahrazují

studie na pacientech, jsou cennými nástroji při zkoumání mnohých důležitých aspektů choroby, které nelze studovat na lidech, jako jsou např. patofyziologické mechanismy v časných fázích kolitidy a účinky nových terapeutických látek. Experimentální modely umožňují odhalovat nové geny, které jsou zodpovědné za náchylnost k IBD. Zvířecí modely jsou využívány při zkoumání působení nových protizánětlivých léků, mimo jiné také ke studiu účinnosti a mechanismu působení probiotik na zánětlivé onemocnění střeva (Okayasu et al., 1990; Ewaschuk a Dieleman, 2006; Kawada et al., 2007; Wirtz a Neurath, 2007).

Experimentální zvířecí modely kolitidy jsou založeny na přenosu imunitních buněk, cílené manipulaci s geny nebo na chemické indukci. Mezi přenosové (transferové) modely patří např. CD45RB^{high} model, kde dochází k přenosu CD45RB^{high} CD4⁺ T buněk ze slezin BALB/c myši do imunodeficitních SCID myši (Severe Combined Immunodeficiency). SCID myši jsou imunodeficitní myši, jimž chybí T a B lymfocyty. Přenos CD45RB^{high} CD4⁺ T buněk následně vyvolá u SCID myši střevní zánět. Zánět je řízen Th1 lymfocyty a je velmi podobný lidskému IBD. Th1 odpověď je zesílená zejména ve střevě pacientů s CD (Powrie, 1995; Štěpánková et al., 2007).

U některých pacientů s IBD byla odhalena mutace genu pro keratin 8, který je jedním z hlavních proteinů intermediárních filament enterocytů. U keratin 8 deficitních myši (keratin 8^{-/-}) se spontánně vyvine kolitida. Tyto myši představují zvířecí experimentální model založený na cílené manipulaci s geny. U myši, kterým cíleně odstraníme gen pro protizánětlivý cytokin IL-10 (IL-10^{-/-}), se spontánně vyvine chronická enterokolitida. Jako u mnoha dalších modelů se kolitida u IL-10^{-/-} myši nevyvine v GF podmínkách, a je tedy závislá na přítomnosti antigenů střevní mikroflóry. Dále např. myši deficitní pro TCR- α řetězec (TCR- α ^{-/-}), který je součástí receptoru T lymfocytů pro antigen (T Cell Receptor, TCR), spontánně vyvinou slizniční zánět velmi podobný lidské UC. Dalším příkladem modelu založeného na cílené manipulaci s geny jsou např. myši deficitní pro gen MDR1 (Multiple Drug Resistant) nebo myši s poruchou STAT3 genu (Signal Transducer and Activator of Transcription) v makrofázích a neutrofilech (Strober et al., 1993; Wirtz a Neurath, 2007).

U experimentálních modelů lze chemicky vyvolat kolitidu podáváním dextranulfátu sodného (DSS); 2,4,6-trinitrobenzensulfonové kyseliny (TNBS)

nebo oxazolonu (Kawada et al., 2007; Wirtz a Neurath, 2007). Výše zmíněné modely jsou nejčastěji užívané chemické modely střevního zánětu. U biologických modelů (např. IL-10^{-/-}) trvá několik měsíců, než se kolitida začne manifestovat, což je pro určité studie nevýhodné. Výhodou chemických modelů je rychlé vyvolání kolitidy (několik dnů), vysoká reprodukovatelnost a nízká finanční náročnost. Modely jsou proto široce využívány pro ověřování účinnosti nových terapeutických látek (Wirtz a Neurath, 2007).

2.5.1 Kolitida vyvolaná podáváním dextransulfátu sodného

Okayasu et al. (1990) vyvolal akutní a chronickou ulcerózní kolitidu u experimentálních myších modelů tím, že jim po určitou dobu podával 2-5 % roztok DSS v pitné vodě. Podávání 2-5 % roztoku DSS po dobu 5-7 dnů vyvolá u myší akutní kolitidu. Kolitida je charakterizována průjmem, rektálním krvácením a úbytkem váhy myší. Histopatologická analýza tlustého střeva odhalí rozsáhlé poškození krypt a střevního epitelu, výraznou infiltraci granulocytů, mononukleárních imunitních buněk a edém sliznice, který je často doprovázen těžkou ulcerací. Patologické skórování je zpravidla prováděno na distálním segmentu tlustého střeva (*colon descendens*), který představuje nejvíce postiženou část. Tlusté střevo je u tohoto modelu signifikantně zkráceno (Okayasu et al., 1990; Kawada et al., 2007).

Podávání DSS v opakujících se cyklech (např. 7 dní DSS, 14 dní voda) vyvolá u experimentálních myší chronickou kolitidu (Wirtz a Neurath, 2007). Okayasu et al. (1990) myším podával 5 % roztok DSS v pitné vodě po dobu sedmi dnů, poté následoval desetidenní příjem obyčejné vody. Tento cyklus opakoval 3-5 x. Při pitvě myší našel signifikantně zvětšené sleziny, ve střevní mukóze a submukóze objevil výraznou infiltraci plazmatických buněk, lymfocytů a makrofágů. Kromě značného poškození sliznice a přítomnosti lymfatických folikulů si všiml také známek dysplazie a regenerace epitelu. Stejně jako u akutní kolitidy zaznamenal zkrácení tlustého střeva (Okayasu et al., 1990). Zatímco časnou změnou akutní DSS indukované kolitidy je postupné poškození krypt, během chronické fáze (14 dní po skončení podávání DSS) jsou výrazná zejména místa regenerace v bazální části *lamina propria*, kde je patrná infiltrace makrofágů a CD4⁺ T buněk. Tyto T lymfocyty produkují zvýšené množství IFN- γ a IL-4, což nasvědčuje tomu, že imunitní odpověď při chronické DSS

indukované kolitidě je řízena jak Th1, tak Th2 buňkami. Dlouhodobé podávání DSS myším vyvolá vznik karcinomu střeva (Kawada et al., 2007).

Kolitida může být navozená jak u BALB/c myši, tak u SCID myši, což dokazuje, že získaná (adaptivní) imunitní odpověď u DSS modelu není pro vyvolání zejména akutní kolitidy klíčová (Wirtz a Neurath, 2007; Kawada et al., 2007). Model akutní kolitidy, která je vyvolaná podáváním DSS, je vhodný zejména pro zkoumání mechanismů přirozené (vrozené) imunity, které jsou zapojené v navození střevního zánětu. DSS model je vhodný také pro studium mechanismů reparace epitelu (Wirtz a Neurath, 2007).

DSS tím, že je přímo toxický pro střevní epitelální buňky bazálních krypt, narušuje integritu slizniční bariéry (Wirtz a Neurath, 2007). Okayasu et al. (1990) popsal, že makrofágy fagocytují částice DSS a následně produkují prozánětlivé cytokiny, které navodí změny na střevní sliznici. Pro vyvolání kolitidy jsou důležité Th1 lymfocyty produkující prozánětlivé cytokiny IL-2 a IFN- γ . Také integrin β_7 na povrchu intraepiteliálních lymfocytů váže DSS, což má za následek proliferaci lymfocytů produkujících cytokiny, které se podílejí na vyvolání UC. Pro vyvolání zánětu je rozhodující přítomnost střevní mikroflóry. Myši chované v GF podmínkách nejeví známky akutní UC, zatímco u zvířat chovaných v konvenčních podmínkách nacházíme ve střevní sliznici zánětlivé změny (Hudcovic et al., 2001). Vývoj UC ovlivňuje i konkrétní složení střevní mikroflóry. Např. enterobakterie rozkládají DSS, což následně vyvolá UC. Sulfát redukující bakterie rozkládají sulfidy a sulfáty na hydrogensulfidy, které potlačují bakteriální fermentaci. Bakteriální fermentací vznikají SCFAs, které poskytují energetický zdroj pro kolonocyty. Jejich nedostatek vyvolá chronický zánět s následným rozvojem UC (Hudcovic et al., 2001).

2.5.2 Kolitida vyvolaná podáváním 2,4,6–trinitrobenzensulfonové kyseliny

V roce 1995 byl Neurathem et al. popsán zvířecí model střevního zánětu, který je vyvolán intrarektálním podáváním 2,4,6-trinitrobenzensulfonové kyseliny (TNBS) v ethanolovém roztoku. Simultánní podávání TNBS a ethanolu je nezbytné pro vyvolání kolitidy, neboť ethanol narušuje epitel a vystavuje pod ním ležící vrstvu *lamina propria* bakteriálním složkám. TNBS je hapten, který je schopen navázat se na proteiny střevní mikroflóry a učinit ji tak imunogenní pro

imunitní systém myši. Střevní zánět vyvolaný tímto způsobem má několik charakteristických rysů společných s lidskou CD. Patří mezi ně transmurální pankolitický charakter zánětu, průjem, rektální prolaps, úbytek váhy myši a navození takové zánětlivé odpovědi, která je řízena IL-12 a Th1 lymfocyty (Kawada et al., 2007; Wirtz a Neurath, 2007). Klíčovou roli v TNBS indukované kolitidě hrají CD4⁺ T lymfocyty, a proto je tento model vhodný zejména ke studiu Th závislé slizniční imunitní odpovědi na střevní zánět (Wirtz a Neurath, 2007).

2.5.3 Kolitida vyvolaná podáváním oxazolonu

Podávání oxazolonu (4-etoxy-methylen-2-fenyl-2-oxazolin-5-on) navodí (na rozdíl od podávání TNBS) u myši kolitidu spojenou s Th2 typem zánětlivé odpovědi. Tento model je indukován rektálním podáváním oxazolonu, který je rozpuštěn v ethanolu a který působí jako haptén. Oxazolonom vyvolaný zánět je omezen na distální úsek tlustého střeva na rozdíl od TNBS kolitidy, která má pankolitický charakter. Kolitida je charakterizována úbytkem váhy myši, průjemem a výraznou ztrátou pohárkových buněk. Histologické znaky a distribuce zánětu odpovídají lidské UC, mikroskopicky se zánět manifestuje jako povrchová ulcerace. V zánětlivé odpovědi převládá Th2 typ imunitní odpovědi řízený IL-4, který je charakterizován zvýšenou hladinou IL-4 a IL-5 spolu s normální produkcí IFN- γ . Oxazolonom vyvolaná kolitida je jedním z mála modelů, který je vhodný ke studiu Th2 závislé imunitní odpovědi a její roli při střevním zánětu (Wirtz a Neurath, 2007; Kawada et al., 2007).

Kolitida navozená podáváním TNBS a oxazolonu myším je kmenově specifická a vyžaduje individuální optimalizaci. Toto demonstruje např. skutečnost, že podávání oxazolonu v nižších dávkách může navodit smíšenou Th1/Th2 závislou kolitidu (Wirtz a Neurath, 2007).

2.6 Cytokiny stanovené při zánětlivém onemocnění střeva

Cytokiny jsou základní regulátory imunitního systému, tkáňové hormony – proteiny sekretované leukocyty a jinými buňkami, které působí prostřednictvím specifických receptorů na různé buňky imunitního systému i mimo něj. Většina cytokinů je ve svých účincích pleiotropní (působí na několik různých druhů buněk), často působí v kaskádě (jeden cytokin indukuje tvorbu druhého) a celý

cytokinový systém je do určité míry redundantní (jednotlivé cytokiny mohou být zastoupeny jinými). Pro některé účely je nezbytně nutné koordinované spolupůsobení několika různých cytokinů. Tyto složité a dosud málo prozkoumané synergistické a antagonistické interakce v cytokinovém systému se označují jako cytokinová síť (Hořejší a Bartůňková, 2001).

2.6.1 Tumor nekrotizující faktor- α

Prozánětlivý cytokin TNF- α indukuje nízní zánět a aktivuje endotelové buňky. Je tvořen monocyty, makrofágy a NK buňkami (Hořejší a Bartůňková, 2001). TNF- α hraje klíčovou roli v patogenezi IBD. TNF- α je zánětlivou sliznicí vylučován ve větším množství (Bai et al., 2006). U pacientů s IBD jsou zjišťovány vyšší sérové koncentrace TNF- α (Matulka, 2001). Tento cytokin patří spolu s IL-6 a IL-12 k antiapoptickým cytokinům, které jsou významné v patogenezi CD (Mudter a Neurath, 2007). TNF- α hraje klíčovou roli zejména v patogenezi Th1 řízené kolitidy. Slizniční TNF- α je nezbytný pro vyvolání a udržování kolitidy navozené podáváním TNBS. TNF- α deficitní myši jsou rezistentní k TNBS a naopak - rozsáhlý zánět se vyvine u myší, které mají zvýšené slizniční hladiny TNF- α (Kawada et al., 2007).

2.6.2 Interleukin- 6

Prozánětlivý cytokin IL-6 stimuluje T a B lymfocyty, podporuje sekreci imunoglobulinů, indukuje syntézu proteinů akutní fáze v játrech a působí jako pyrogen. Je vylučován Th2 lymfocyty, makrofágy a neutrofily (Hořejší a Bartůňková, 2001). U pacientů s IBD byla prokázána patofyziologická role a klinický význam produkce IL-6. Cytokin IL-6 podporuje přežití T lymfocytů tím, že navozuje jejich rezistenci k apoptóze v *lamina propria* zánětlivého ložiska. CD4⁺ T buňky se pak mohou v ložisku nepřiměřeně akumulovat a vyvolat chronický zánět. Sérové hladiny IL-6 korelují s klinickou, endoskopickou a histopatologickou aktivitou choroby. Při nasazení protizánětlivé léčby sérové hladiny IL-6 klesají. Vysoké hladiny IL-6 v séru jsou spojovány s vyšší frekvencí relapsů u pacientů s CD. IL-6 je pokládán za hlavní cytokin při kolitidě navozené u experimentálních myších modelů, kde je produkován jak T lymfocyty, tak makrofágy (Matulka, 2001; Mudter a Neurath, 2007). IL-6 hraje klíčovou roli při navození a udržování kolitidy vyvolané podáváním DSS, naopak myši

s vyřazeným genem pro IL-6 jsou rezistentní k DSS indukované kolitidě (Matsumoto et al., 2005; Kawada et al., 2007).

2.6.3 Interleukin-10

Protizánětlivý cytokin IL-10 má centrální roli v regulaci zánětlivé kaskády, inhibuje Th1 lymfocyty a makrofágy a indukuje diferenciaci B lymfocytů na plazmocyty. Je tvořen Th2 lymfocyty, makrofágy a neutrofilny (Hořejší a Bartůňková, 2001). IL-10 inhibuje uvolňování zánětlivých mediátorů z monocytů a tím působí protizánětlivě (Matulka, 2001). U pacientů s IBD byla popsána nedostatečná produkce IL-10, který následně nemůže regulovat hladiny prozánětlivých cytokinů v *lamina propria* (Matulka, 2001; Osman et al., 2006). IL-10 obnovuje toleranci T buněk k rezidentní mikroflóře, bakteriální kmeny schopné indukovat jeho produkci jsou kandidáty pro léčbu IBD. Klinické studie ukázaly ekvivalenci se standartní medikací při udržování remise UC (Kokešová et al., 2006). Steidler et al. (2000) úspěšně léčil kolitidu u myši pomocí *Lactococcus lactis* secernujícího IL-10. Již bylo zmíněno, že u myši, kterým cíleně odstraníme gen pro IL-10, se spontánně vyvine chronická enterokolitida (Wirtz a Neurath, 2007).

2.6.4 Další cytokiny, jejichž stanovení je významné při zánětlivém onemocnění střeva

Postižená střevní sliznice pacientů s IBD produkuje zvýšené množství prozánětlivého cytokinu IL-1 β . Je produkován aktivovanými monocyty a makrofágy. IL-1 hraje roli při vývoji kolitidy navozené podáváním DSS u myši (Kankuri et al., 2003; Osman et al., 2006).

U pacientů s IBD byly také detekovány zvýšené hladiny IL-8 (Osman et al., 2006). Tento cytokin je významný v patogenezi IBD tím, že přitahuje na místo zánětu neutrofilní granulocyty, které svojí aktivitou (proteolytickými enzymy, myeloperoxidázami, reaktivními produkty kyslíku a dusíku apod.) poškozují tkáň (Buc, 2004; Bai et al., 2006).

Makrofágy vylučovaný IL-18 je dalším mediátorem zánětu při DSS indukované kolitidě. Neutralizace IL-18 zmírní střevní poškození tohoto modelu (Kawada et al., 2007).

IFN- γ je cytokinem Th1 imunitní odpovědi. Jedná se o antagonistu Th2 cytokinu IL-4. Je produkován NK buňkami v závislosti na přítomnosti IL-12 (Kokešová et al., 2006). Zvýšená produkce IFN- γ je detekována u většiny experimentálních modelů Th1 řízené kolitidy (Kawada et al., 2007).

Naproti tomu IL-4 a IL-13, které jsou produkovány NK buňkami, hrají klíčovou roli v patogenezi Th2 řízené kolitidy, včetně oxazolonom navozené kolitidy (Kawada et al., 2007).

Za fyziologických okolností zánětlivé a imunitní procesy ve střevě udržuje pod svojí kontrolou protizánětlivý cytokin TGF- β . TGF- β má důležitou funkci při reparaci tkání. Bylo zjištěno, že u CD je aktivita tohoto cytokinu snižena (Buc, 2004). TGF- β je produkován T lymfocyty a makrofágy (Kawada et al., 2007).

Další cytokin TGF- α je také ochranným cytokinem při DSS indukované kolitidě a navozuje hojení střeva (Kawada et al., 2007).

3 Experimentální část

3.1 Materiál

3.1.1 Bakterie

Kmen bakterií *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P (Sbírka mlékařských mikroorganismů, Laktoflora, Tábor, ČR) byl izolován ze stolice kojenců a dodán v lyofilizovaném stavu ve skleněných lahvičkách (10 ml).

3.1.2 Myši

K pokusům bylo použito 15 konvenčních inbredních BALB/c myší (9 samic, 6 samců) ve stáří 11 týdnů. Myši byly chované podle zásad Správné laboratorní praxe v oddělených plastových boxech (odchovna MBÚ AV ČR) s režimem 12 hodin světla a 12 hodin tmy při teplotě 22 °C, kmené *ad libitum* standardní peletovanou stravou (ST1, Fyziologický ústav AV ČR) a vodou (Štěpánková, 1997). Hmotnost jedinců se pohybovala mezi 20-25 g.

3.1.3 Média, roztoky a činidla

- MRSC médium
 - Do 1000 ml destilované vody bylo přidáno 52 g MRS bujónu (de Man-Rogosa-Sharpe) (Oxoid, Hampshire, VB) a 2 g NaHCO₃ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo). pH bylo upraveno na hodnotu 6,2. Médium bylo vysterilizováno autoklávováním při 121 °C po dobu 15 min.

- MRS agar
 - Do 1000 ml destilované vody bylo přidáno 62 g MRS agaru (Oxoid, Hampshire, VB). pH bylo upraveno na hodnotu 6,2. Agar byl vysterilizován autoklávováním při 121 °C po dobu 15 min.

- kompletní RPMI 1640 médium
 - Do 500 ml RPMI 1640 média s L-glutaminem a NaHCO₃ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo) bylo sterilně přidáno 50 ml fetálního bovinního séra (Biochrom, Berlín, Německo), 10 ml

1M HEPES (N-[2-hydroxyethyl] piperazin-N'-[2-ethansulfonová kyselina]) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo) a 5 ml roztoku penicilinu (10 000 U/ml v 0,9 % NaCl) a streptomycinu (10 mg/ml v 0,9 % NaCl) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo). Výsledná koncentrace penicilinu v RPMI 1640 byla 100 U/ml a koncentrace streptomycinu byla 100 µg/ml.

- fosfátový pufr (Phosphate-Buffered Saline, PBS)
 - NaCl (Penta, Chrudim, ČR) 8,3 g
 - KCl (Fluka Chemie, Švýcarsko) 0,2 g
 - KH₂PO₄ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo) 0,2 g
 - Na₂HPO₄ · 12 H₂O (Penta, Chrudim, ČR) 1,91 g
 - destilovaná voda doplnění do 1000 ml

pH roztoku bylo upraveno na 7,4. Roztok byl zfiltrován a sterilizován autoklárováním při 121 °C po dobu 15 min.

- lyzační pufr
 - NH₄Cl (Pliva-Lachema, Brno, ČR) 8,29 g
 - KHCO₃ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo) 1 g
 - EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo) 37,2 mg
 - destilovaná voda doplnění do 1000 ml

pH roztoku bylo upraveno na 7,2-7,4. Roztok byl sterilizován filtrací přes 0,2 µm filtr.

- dextransulfát sodný (DSS), 3 %
 - DSS, m. w. 40 kDa (ICN Biomedicals, Ohio, USA) 12 g
 - pitná voda doplnění do 400 ml

- trypanová modř; 0,4 % roztok (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

- formaldehyd, 1 %
 - formaldehyd 36-38 % (Penta, Chrudim, ČR) 2,7 ml
 - PBS doplnění do 100 ml

- DuoSet ELISA (R&D Systems, Minneapolis, USA)
 - “capture“ protilátka (polyklonální kozí protilátka proti myššímu cytokinu)
 - standard (rekombinantní myšší cytokin)
 - detekční protilátka (biotinylovaná polyklonální kozí protilátka proti myššímu cytokinu)
 - streptavidin-HRP (Horse Radish Peroxidase, křenová peroxidáza konjugovaná se streptavidinem)
 - ředění 1:200 streptavidin-HRP v ředicím roztoku

- roztoky požadované pro stanovení cytokinů podle DuoSet ELISA:
 - Tween 20 (Serva, Heidelberg, Německo)
 - promývací roztok (Wash Buffer, WB) (0,05 % Tween 20 v PBS)
 - bovinní sérový albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
 - blokovací roztok (Block Buffer, BB) (0,1 % BSA v PBS)
 - ředicí roztok (Reagent Diluent, RD) (0,1 % BSA v PBS)
 - tetramethylbenzidin (TMB) chromogen/substrátový roztok (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
 - zastavovací roztok 1M H₂SO₄ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

- komponenty pro histologii:
 - paraformaldehyd, 4 %
 - paraformaldehyd (Sigma-Aldrich, Německo) 2 g
 - 1M NaOH (Sigma-Aldrich, Německo) 100 µl
 - PBS doplnění do 50 ml

pH roztoku bylo upraveno na 7,2 a roztok byl zfiltrován.
 - ethanol (Pliva-Lachema, Brno, ČR)

- ether (Tamda, Olomouc, ČR)
- methylsalicylát (Lachema, Blansko, ČR)
- benzen (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- benzenparafín
 - Do nádoby s benzenem byl při 40 °C přidáván parafín (Paraplast X-TRA), až se přestal rozpouštět.
- Paraplast X-TRA (Tyco Healthcare, Mansfield, USA)
 - Pelety byly rozpuštěny při 56 °C.
- xylen (Penta, Chrudim, ČR)
- uhličitan vápenatý (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- butanol (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- kyselina chlorovodíková (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- hematoxylin Harrisův
 - roztok A: Na vodní lázni bylo rozpuštěno 5 g hematoxylinu (Fluka Chemie, Švýcarsko) v 50 ml 96 % alkoholu za tepla.
 - roztok B: V 1000 ml vařící destilované vody bylo rozpuštěno 100 g síranu hlinitoamonného (Pliva-Lachema, Brno, ČR). Smísil se roztok A s roztokem B a povařil se. Do vařící tekutiny bylo přidáno 2,5 g oxidu rtuťnatého (Pliva-Lachema, Brno, ČR). Tekutina se rychle ochladila ponořením nádoby do studené vody a bylo přidáno 40 ml kyseliny octové ledové (Riedel-de Haën, Seelze, Německo). Před použitím byl roztok přefiltrován.
- eozin žlutý
 - Byl připraven 0,5 % vodný roztok eozinu (Fluka Chemie, Švýcarsko) a roztok byl přefiltrován.
- alciánová modř 8 GS
 - Byl připraven 1 % roztok alciánové modři 8 GS (Fluka Chemie, Švýcarsko) v 3 % kyselině octové (Pliva-Lachema, Brno, ČR). Roztok byl přefiltrován.
- jádrová červeň (Vector, Burlingame, USA)
 - Roztok byl před použitím přefiltrován.
- kanadský balzám (Carl Roth, Karlsruhe, Německo)

3.1.4 Pomůcky

- skleněné zkumavky
- polypropylenové zkumavky, 10 ml (Meus, Itálie)
- polystyrenové zkumavky, 15 ml (Gama, České Budějovice, ČR)
- eppendorfské zkumavky (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- mikrozksamavky, 200 μ l (Molecular BioProducts, San Diego, USA)
- falkony, 50 ml (TPP, Švýcarsko)
- odměrné válce
- Erlenmeyerovy baňky
- kádinky
- skleněné barvicí kyvety
- mikrokyvety (Kartell, Austrálie)
- automatické pipety Finnpiquette
- automatické pipety (Gilson, Francie)
- sterilní serologické pipety, 5 ml (TPP, Švýcarsko)
- Pasteurovy pipety (Alpha, Hampshire, VB)
- Petriho misky (TPP, Švýcarsko)
- plynový kahan
- gumové sondy
- skleněné injekční stříkačky (Chirana, Ostrava, ČR)
- sterilní injekční stříkačky Inzulin U40 s jehlou, 1 ml (Gama, České Budějovice, ČR)
- preparační chirurgické nástroje – nůžky, pinzety
- polystyrenová podložka
- skleněné lahvičky, 20 ml (Kimble, USA)
- sterilní sítko Cell strainer, 70 μ m (BD Falcon, USA)
- sterilní filtr; 0,2 μ m (Corning, USA)
- podložní a krycí mikroskopická sklíčka
- Bürkerova komůrka (Meopta, Přerov, ČR)
- 24jamkové polystyrenové desky (TPP, Švýcarsko)
- mikrotitrační destičky (Gama, České Budějovice, ČR)

3.1.5 Přístroje

- laminární box Steril-VBH Compact (Schoeller Instruments, ČR)
- laminární box Aura 2000 M.A.C. (Bioair Instruments, Itálie)
- termostat CO₂ inkubátor model MCO-17 AI (Sanyo, Japonsko)
- termostat (Heraeus, Hanau, Německo)
- termostat (Chirana, Ostrava, ČR)
- spektrofotometr Ultrospec 2100 pro (Biochrom, Cambridge, VB)
- ELISA plate reader Multiscan RC V1. 5-0 (Ani Labsystems Oy, Finsko)
- vortex MS 3 B (Ika, Staufen, Německo)
- centrifuga Biofuge Stratos (Heraeus, Hanau, Německo)
- centrifuga Universal 30 RF typ 1402 (Hettich, Teittlingen, Německo)
- minicentrifuga model IR (Carl Roth, Karlsruhe, Německo)
- magnetická míchačka typ 50 (Lavet, Chotutice, ČR)
- laboratorní váhy Kern EW2200-2NM (Kern&Sohn, Balingen, Německo)
- analytické váhy Precisa 40SM-200A (Dietikon, Švýcarsko)
- sáňkový mikrotom (Reichert, Rakousko)
- světelný mikroskop (Meopta, Přerov, ČR)
- fluorescenční mikroskop Olympus BX 40 (Olympus, Tokio, Japonsko)
- digitální kamera Olympus Camedia DP 70 (Olympus, Tokio, Japonsko)
- program Olympus DP soft
- grafický program Gimp
- program Labsystems Genesis
- program Microsoft Excel

3.2 Pracovní postup

3.2.1 Obnova lyofilizované bakterie a její kultivace

Nepatogenní kmen bakterie *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P byl dodán v lyofilizovaném stavu. Odstranili jsme hliníkovou víčku z 10 ml skleněných lahviček. V laminárním boxu jsme sterilní pinzetou odstranili gumovou zátku. Vzhledem k vakuu v lahvičkách jsme pracovali v blízkosti plamene, aby nedošlo ke kontaminaci obsahu lahvičky. Lyofilizovaný obsah jsme rozpustili ve sterilním MRSC bujónu. Bakteriální suspenzi jsme přenesli Pasteurovou pipetou do zkumavek se 7 ml MRSC média. Kultivace probíhala při 37 °C do zakalení půdy. Obnovenou kulturu jsme minimálně 2krát přeočkovali 1-2 % inokula do sterilního média a nechali kultivovat opět při optimálních podmínkách.

3.2.2 Stanovení růstové křivky bakterie

Množství bakterií v kultivačním médiu jsme zjišťovali z růstové křivky. Růstovou křivku kmene *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P jsme stanovili během kultivace v MRSC bujónu odebráním vzorků v hodinových intervalech a měřením absorbance při 650 nm. Jako blank (slepý vzorek) sloužil MRSC bujón. Při hodnotě absorbance (A_{650}) vyšší než 0,75 jsme vzorek i blank 10krát naředili v PBS a hodnotu absorbance přepočítali ($A_{650} \times$ ředění vzorku). Vždy po hodině kultivace v MRSC bujónu jsme bakteriální suspenzi naředili desítkovým ředěním v PBS a vždy 1 ml bakteriální suspenze o vhodné koncentraci jsme zalili na Petriho misku do MRS agaru. Takto naředěnou bakteriální kulturu jsme kultivovali na Petriho miskách v termostatu po dobu 48 hodin při 37 °C. Poté jsme na příslušných Petriho miskách s označeným ředěním odečetli počet kolonií a přepočítali na jednotku 10^8 cfu/ml.

- výpočet:
 - odečteno např. 13 kolonií při ředění 10^{-7}
 - počet kolonií = 13×10^7 cfu/ml = $1,3 \times 10^8$ cfu/ml

3.2.3 Příprava bakteriální suspenze pro sondování

Bakteriální suspenze pro sondování jsme připravovali denně. Bakteriální kulturu (0,1 ml) jsme zaočkovali do zkumavky s 10 ml MRSC média. Po 7 hodinách, kdy se bakterie nacházely v exponenciální fázi růstu, jsme kulturu zvortexovali a naředili 1:10 (100 μ l + 900 μ l PBS). Absorbanci jsme změřili spektrofotometricky při vlnové délce 650 nm (A_{650}) proti médiu naředěnému také 1:10. Podle růstové křivky jsme stanovili počet cfu/ml. Kulturu jsme zcentrifugovali (5 000 ot/10 min/RT) a naředili médiem MRSC na koncentraci 10^9 cfu/ml.

3.2.4 Inaktivace bakterie

Pro inaktivaci bakteriální kultury jsme použili 1 % roztok formaldehydu v PBS. Bakteriální kulturu jsme zcentrifugovali (5 000 ot/10 min/ RT). Supernatant odlili a bakterie resuspendovali v 25 ml PBS, promíchali na vortexu a stanovili absorbanci (A_{650}). Určili jsme počet cfu/ml. Resuspendovanou kulturu jsme znovu za stejných podmínek zcentrifugovali a k peletě přilili 1 % roztok formaldehydu (50 ml v PBS). Po 3 hodinách stání při pokojové teplotě byla bakteriální kultura inaktivována. Inaktivovanou bakteriální kulturu jsme 2krát zcentrifugovali a promyli v PBS, aby mohla být nakonec naředěna na koncentraci 10^9 cfu/ml a uložena až do použití při -20 °C. Účinnost inaktivace bakteriální kultury jsme otestovali zalitím vzorku do MRS agaru s následnou 48hodinovou kultivací a kontrolou nulového růstu.

3.2.5 Schéma experimentu

K pokusu jsme použili konvenční BALB/c myši, které jsme rozdělili do tří skupin po 4-6 myších. První skupině jsme i. g. (gumovou sondou připevněnou na skleněné injekční stříkačce, viz. obrázek 5) aplikovali *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P v koncentraci 2×10^8 cfu/200 μ l MRSC média (jedna dávka na myš). Myši dostaly tuto dávku 1., 4. a 8. den pokusu. Od 10. do 15. dne dostávaly tuto dávku denně společně s 3 % roztokem DSS. Všechny myši dostávaly 3 % DSS v pitné vodě *ad libitum* po dobu 5 dnů. Druhé skupině myši jsme podle stejného schématu místo *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* aplikovali 200 μ l kultivačního MRSC média. Cílem bylo zjistit, zda médium nebude působit jako prebiotikum. Třetí skupině myší, která sloužila jako skupina kontrolní, jsme

podobně sondou i. g. aplikovali 200 μ l PBS (viz. obrázek 5). Myši jsme denně vážili a prohlíželi a hodnotili jsme následující klinické příznaky - změnu váhy myši, průjem, rektální prolapsy a krvácení z rektu. Myši jsme usmrtili po 5 dnech podávání DSS. Podrobné schéma podávání *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P, MRSC, PBS a DSS uvádí tabulka 3.



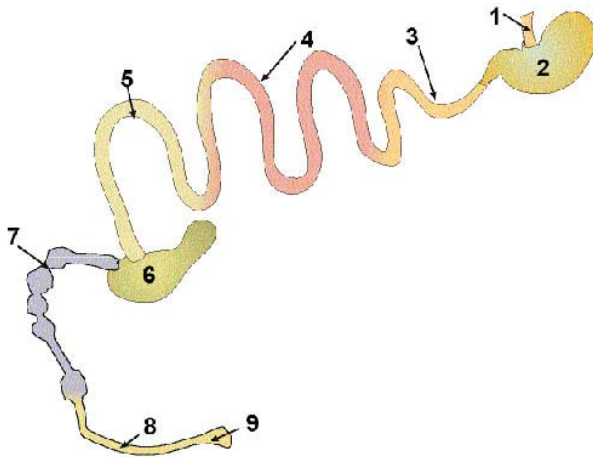
Obrázek 5 - Intragastrické sondování myši

Tabulka 3 - Schéma podávání *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P, MRSC, PBS a DSS experimentálním myším

Den pokusu	D 1	D 4	D 8	D 10-14	D 15
	Voda	Voda	Voda	DSS	
1. skupina <i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> RL14-P	200 µl <i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> RL14-P	200 µl <i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> RL14-P	200 µl <i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> RL14-P	200 µl <i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> RL14-P	Konec
2. skupina MRSC médium	200 µl MRSC	200 µl MRSC	200 µl MRSC	200 µl MRSC	Konec
3. skupina PBS	200 µl PBS	200 µl PBS	200 µl PBS	200 µl PBS	Konec

3.2.6 Ukončení experimentu

Myši jsme zvážili a usmrtili vykrvácením ze srdce v etherové anestezii podle pravidel etické komise MBÚ AV ČR. (K vykrvácení ze srdce jsme použili sterilní inzulinové injekční stříkačky.) Sterilně jsme vyjmuli mezenteriální lymfatické uzliny (vždy všechny z jedné experimentální skupiny myší do jedné Petriho misky s RPMI 1640) a sleziny (každou zvlášť do Petriho misky s RPMI 1640). Změřili jsme délku tlustého střeva. Z každé části tlustého střeva (*colon ascendens* a *colon descendens*, viz. obrázek 6) jsme odebrali dva 0,5-1 cm dlouhé úseky, které jsme podélně rozstříhli, opláchli v RPMI 1640, rozpůlili je a připravili pro další kultivaci. Pro histologické hodnocení zánětlivých změn jsme odebrali 1 cm kousky *colon descendens* do 4 % paraformaldehydu. Krev jsme po jejím sražení zcentrifugovali (2 000 g/5 min/4 °C) a sérum zamrazili při -40 °C.



Obrázek 6 - Gastrointestinální trakt myši

1) jícen, 2) žaludek, 3) duodenum, 4) jejunum, 5) ileum, 6) slepé střevo, 7) *colon ascendens*, 8) *colon descendens*, 9) rektum

(www3.niaid.nih.gov)

3.2.7 Kultivace slezinných buněk a buněk mezenterálních lymfatických uzlin

Sleziny jsme rozvolnili 2 pinzetami a buněčnou suspenzi přefiltrovali přes sterilní sítko (70 μm) do falkony. Suspenze buněk jsme zcentrifugovali při 1 500 ot/min (500 x g) po dobu 7 minut. Peletu jsme rozvolnili pipetou a buňky zhemolyzovali 3 ml lyzačního pufru. Po 3 minutách jsme buněčnou lýzu zastavili přidávkem 13 ml kompletního RPMI 1640. Poté jsme suspenze znovu stočili (500 g/7 min) a peletu resuspendovali ve 3 ml RPMI 1640. Odebrané mezenterální lymfatické uzliny (MLU) jsme rozdělili do tří vzorků podle zařazení myši do jednotlivých experimentálních skupin. MLU jsme zpracovali obdobně jako sleziny, lýza buněk nebyla nutná.

Počet živých buněk v suspenzích jsme stanovili po obarvení v trypanové modři. Do jedné řady jamek v mikrotitrační destičce jsme si připravili 200 μl RPMI 1640 a do druhé řady 150 μl trypanové modři na jamku. Ke 200 μl RPMI 1640 jsme přidávali 50 μl buněk (5x ředěno) z jednotlivých buněčných suspenzí, promíchali a přenesli 50 μl této suspenze do trypanové modři (4x ředěno). Špičkou jsme promíchali obsah jamek a po 5 minutách živé buňky spočítali v Bürkerově komůrce. Mrtvé buňky se barví modře, živé buňky trypanovou modř nepohlcují (Freshney, 1987).

- výpočet:
 - počítaný objem = počet čtverců x objem čtverce
= $50 \times 0,2 \text{ mm} \times 0,2 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm} = 0,2 \text{ } \mu\text{l}$
 - buňky v 1 ml = 5×10^3 x ředění (20) x počet buněk
= počet buněk x 10^5
 - jednotky: počet buněk x $10^5/\text{ml}$

Po zjištění počtu buněk jsme buněčné suspenze naředili na pracovní koncentraci $5 \times 10^6/\text{ml}$. Slezinné buňky a buňky MLU jsme kultivovali na 24jamkové polystyrenové desce (1 ml – 1 jamka) s plochým dnem jednak samotné a jednak s přidavkem inaktivovaného *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P v koncentraci 5×10^7 cfu/ml na jamku. (Do jamek jsme dávkovali 50 μl předem připravené suspenze inaktivovaných bakterií o koncentraci 10^9 cfu/ml. Na jednu buňku připadalo 10 bakterií.) Kultivace probíhala 48 hodin v termostatu při 37 °C v atmosféře s přidavkem 5 % CO₂. Poté jsme desky zcentrifugovali (1 500 ot/10 min/4 °C) a z každé jamky jsme do eppendorfských zkumavek stáhli 750 μl supernatantu. Supernatanty jsme zamrazili při -40 °C až do doby stanovení cytokinů.

3.2.8 Kultivace střevních kousků

Z *colon ascendens* a *colon descendens* jsme odebrali dva 0,5-1 cm úseky, které jsme podélně rozstříhli, opláchli v RPMI 1640, rozpůlili a zvážili. Jednotlivé střevní kousky jsme využili pro kultivaci na pozdější stanovení cytokinů ze supernatantů. Kultivace střevních kousků probíhala na 24jamkové polystyrenové desce 48 hodin v 1 ml kompletního RPMI 1640 (inkubátor 37 °C, 5 % CO₂). Střevní kousky byly kultivovány samotné nebo byly restimulovány *in vitro* formou inaktivovaným *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P v koncentraci 5×10^6 cfu/ml na jamku. (Do jamek jsme dávkovali 5 μl předem připravené suspenze inaktivovaných bakterií o koncentraci 10^9 cfu/ml.) Po 48 hodinách kultivace jsme obsah každé jamky přepipetovali do číslky označených eppendorfových zkumavek. Zkumavky jsme zcentrifugovali (15 000 ot/10 min/4 °C). 750 μl supernatantu z každé zkumavky jsme přepipetovali do eppendorfových zkumavek a zamrazili při -40 °C až do doby stanovení cytokinů.

3.2.9 Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA)

Sendvičová ELISA je citlivá metoda pro kvantifikaci substancí, jako jsou hormony, antigeny infekčních onemocnění, cytokiny apod. v koncentraci pg- μ g/ml (Crowther, 1995).

Dle Crowthera (1995) jsou základní kroky metody následující:

- **Imobilizace protilátky na pevný nosič**
 - Na pevnou fázi se protilátka váže pasivní adsorpcí. Nejčastěji jsou jako pevné nosiče používány 96jamkové (8 x 12 jamek) polystyrenové mikrotitrační destičky. Navázání je výsledkem hydrofóbních interakcí mezi nepolárními strukturami proteinů a povrchem destičky.

- **Promývání**
 - Účelem promývání je oddělit navázané a nenavázané reagenty. Nejdříve se z jamek odsají reaktanty a jamky se naplní promývacím roztokem. Ten se posléze opět odsaje a jemným vyklepnutím se odstraní zbytek promývacího roztoku. Tento postup se zopakuje nejméně třikrát.

- **Blokování nespecifické reakce**
 - K eliminaci nespecifických vazeb mezi proteiny a volnými vazebnými místy destičky se používá tzv. blokovacích roztoků. Jedná se o imunologicky inertní látky, které se aplikují samostatně nebo se přidávají do ředicích roztoků.

- **Vznik sendvičového komplexu**
 - Antigen se naváže na specifickou protilátku zakotvenou na stěnách jamek mikrodestičky. Na antigen se v dalším kroku naváže konjugát, což je specifická protilátka značená enzymem. Konjugát pak v dalším kroku reaguje s příslušným substrátem za vzniku barevného produktu. Nejčastěji užívaným enzymem je křenová peroxidáza. Substrátem pro peroxidázu je obvykle

peroxid vodíku, z něhož se účinkem enzymu uvolňuje kyslík. Ten pak oxiduje příslušný bezbarvý chromogen za vzniku barevných reakčních produktů. Pro testy ELISA se často používá chromogen TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin). Reakční produkty jsou jasně modré, po zastavení reakce se jejich barva mění na žlutou s maximem absorpce při 450 nm.

- **Zastavení reakce**

- K zastavení barevné reakce dojde přidáním tzv. zastavovacího roztoku, což je zpravidla silná kyselina. Ta způsobí rychlou denaturaci enzymů. Přidáním zastavovacího roztoku se mění absorpční spektrum produktu. Intenzita zbarvení produktu je přímo úměrná koncentraci antigenu ve vzorku.

3.2.9.1 Stanovení cytokinů metodou ELISA

V supernatantech po kultivaci slezinných lymfocytů, buněk MLU a střevních kousků (*colon ascendens* a *colon descendens*) jsme metodou ELISA stanovili cytokiny TNF- α , IL-6 a IL-10. Hladiny cytokinů v supernatantech po kultivaci střevních kousků jsme vždy přepočítali na 10 mg tkáně. Cytokiny jsme stanovovali podle protokolu DuoSet ELISA.

Naředili jsme "capture" protilátku na pracovní koncentraci v PBS a dávkovali 100 μ l na jamku mikrotitrační destičky. Ředění protilátky je různé pro různé cytokiny a řídí se doporučením výrobce. Desku pokrytou fólií jsme inkubovali přes noc. Po promytí (WB, vždy 3x) a osušení desky jsme každou jamku naplnili 300 μ l BB. Inkubace probíhala 1 hod.

Mezitím jsme připravili standardní roztoky, abychom vytvořili kalibrační křivku o osmi bodech. Díky kalibrační křivce je možné odečítat hladiny cytokinů ve stanovovaných neznámých vzorcích. Ze zásobního standardu jsme pomocí sériového ředění v RD získali standardní roztoky o klesající koncentraci. Pro ředění standardu jsme si připravili osm očíslovaných eppendorfských zkumavek. Do první jsme nadávkovali 500 μ l RD a do zbylých sedmi 250 μ l RD. Do první zkumavky jsme přidali doporučený objem standardu. Takto naředěný roztok jsme promíchali a přenesli 250 μ l tohoto roztoku do druhé zkumavky s 250 μ l

RD, opět dobře promíchali a přenesli 250 µl vytvořeného roztoku do další zkušavky s 250 µl RD. Nakonec jsme získali sedm zkušavek s naředěným standardem. Poslední osmá zkušavka obsahovala pouze 250 µl RD bez standardu. Teoretické výsledné koncentrace standardů byly 2 000, 1 000, 500, 250, 125, 63, 31 a 0 pg/ml.

Po promytí desky (WB) jsme nádvkovali 50 µl standardu nebo 50 µl vzorku na jamku. Vzorky i standardy jsme dávkovali v duplikátech a výsledky vyjádřili jako průměr dvou naměřených hodnot. Inkubace probíhala 2 hod. Po promytí (WB) a osušení desky jsme dávkovali 100 µl detekční protilátky (naředěné v RD podle pokynů výrobce) na jamku. Inkubace probíhala 2 hod. Po promytí (WB) a osušení desky jsme dávkovali 100 µl streptavidin-HRP (ředění vždy 1:200 v RD) na jamku a nechali inkubovat 20 min. Kryli jsme desku před přímým slunečním světlem. Po důkladném promytí (WB) a osušení desky jsme dávkovali 100 µl TMB na jamku a nechali inkubovat 20 min. Opět jsme kryli desku před přímým slunečním světlem. Poté jsme do každé jamky dávkovali 50 µl 1M H₂SO₄ a spektrofotometricky změřili optickou hustotu jamek při 450 nm pomocí čtečky desek (ELISA plate reader). Optická hustota je přímo úměrná koncentraci cytokinu ve vzorku. Veškeré kroky probíhaly při pokojové teplotě.

Výsledky vyhodnotil počítačový program Genesis. Při každém měření bylo nutné zkontrolovat programem zhotovenou kalibrační křivku a její linearitu v takovém koncentračním rozmezí, ve kterém se nacházely neznámé vzorky. V některých případech bylo nutné vzorky naředit a po stanovení změřené hodnoty zpětně vynásobit faktorem zředění. Vzorky získané z kultivace slezinných lymfocytů, které byly *in vitro* restimulované inaktivovaným *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P, byly naředěny pro stanovení TNF-α 5krát a pro stanovení IL-6 3krát. Vzorky získané z kultivace střevních kousků byly pro stanovení IL-6 naředěny 4krát.

3.2.10 Histologické hodnocení zánětlivých změn tlustého střeva

Všem myším jsme odebrali 1 cm kousky *colon descendens*. Tkáně jsme dle následujícího postupu kladli do skleněných lahvíček s připravenými médii:

- **chemická fixace tkáně**
 - 4 % paraformaldehyd 48 hod, 22 °C

- **odvodnění tkáně**
 - 70 % ethanol 2 hod, 22 °C
 - 80 % ethanol 2 hod, 22 °C
 - 96 % ethanol 6 hod, 22 °C
 - 100 % ethanol I. 1 hod, 22 °C
 - 100 % ethanol II. 1 hod, 22 °C
 - 100 % ethanol III. 1 hod, 22 °C

- **prosycení tkáně látkou rozpouštějící parafín**
 - methylsalicylát I. 4 hod, 22 °C
 - methylsalicylát II. 4 hod, 22 °C
 - methylsalicylát III. 8 hod, 22 °C
 - benzen I. 10 min, 22 °C
 - benzen II. 10 min, 22 °C
 - benzen III. 10 min, 22 °C

- **prosycení tkáně parafínem**
 - benzenparafín 30 min, 40 °C
 - parafín I. 2 hod, 58 °C
 - parafín II. 4 hod, 58 °C
 - parafín III. 8 hod, 58 °C

Tkáně jsme zalévali parafínem (60 °C) do zalévacích komůrek složených z papíru. Zalévací komůrky jsme poté rychle pokládali do studené vody, aby parafín rychle ztuhnul. Na mikrotomu jsme ze ztvrdlých parafínových bločků nařezali příčné řezy o tloušťce 7 μm . Řezy jsme kladli na hladinu teplé

destilované vody (40 °C) a štětcem je usazovali na podložní sklíčka. Preparáty jsme po usušení obarvili hematoxylin-eozinem (H&E). Barvení alcianovou modří (s dobarvením jádrovou červení) jsme použili k obarvení mucinu sekretovaného pohárkovými buňkami.

Postup barvení preparátů H&E v barvicích kyvetách byl následující:

- **odparafínování**

- xylen I 5 min
- xylen II 5 min
- ethanol 100 % 5 min
- ethanol 96 % 5 min
- voda 5 min

- **barvení**

- hematoxylin 10 min
- voda pouze opláchnout
- diferencování v kyselém ethanolu (3-5 kapek HCl do 100 ml 96 % ethanolu) – několik vteřin za kontroly v mikroskopu
- praní v tekoucí vodě (s přidavkem 1 lžičky uhličitanu vápenatého do kyvety) 5 min
- eozin 3 min
- destilovaná voda pouze opláchnout
- diferencování v 80 % ethanolu - krátce za kontroly v mikroskopu

- **odvodnění**

- ethanol 96 % 3 min
- ethanol 100 % 5 min
- butanol 5 min

- **projasnění**

- xylen I 5 min
- xylen II 5 min

- **montování** obarvených řezů mezi podložní a krycí sklíčko do kanadského balzámu

Výsledek barvení H&E: jádra buněk se obarví modře, kolagenní vazivo růžově, svalstvo červeně.

Barvení preparátů alciánovou modří s dobarvením jádrovou červení:

- odparafínování (viz. H&E)
- opláchnutí v destilované vodě
- alciánová modř 2 hod
- opláchnutí v destilované vodě
- jádrová červen 10 min
- opláchnutí v destilované vodě
- odvodnění (viz. H&E)
- projasnění (viz. H&E)
- zamontování do kanadského balzámu

Výsledek barvení alciánovou modří s dobarvením jádrovou červení: kyselé mukopolysacharidy se barví modrozeleně, jádra buněk červeně.

Preparáty jsme hodnotili pod mikroskopem při 100násobném zvětšení, fotodokumentaci zhotovili digitální kamerou a obrázky zpracovali v programech Olympus DP soft a Gimp.

3.2.10.1 Hodnocení stupně poškození tlustého střeva

Hodnocení stupně poškození povrchového epitelu a deformace krypt tlustého střeva jsme provedli dle Cooperova testu (Cooper et al., 1993). Byly stanoveny 4 stupně poškození:

- **0. stupeň**
 - beze změn
- **1. stupeň**
 - dilatace a zkrácení krypt o 1/3

- zeslabení epitelu
 - poškozeno 1-25 % sliznice tlustého střeva na jeho průřezu
 - mezi bází krypt a *muscularis mucosae* se objevuje hyalinová vrstva znázorňující časně poškození střeva
 - je zeslabeno perikryptové kolagenové pouzdro
 - mírné zbytnění kolagenu mezi kryptami
 - bez zánětlivých změn
- **2. stupeň**
 - poškozeno 26-50 % sliznice tlustého střeva na jeho průřezu
 - zkrácení krypt o 2/3
 - bez zánětlivých změn
- **3. stupeň**
 - poškozeno 51-75 % sliznice tlustého střeva na jeho průřezu
 - vymizení krypt
 - povrchový epitel zachován
 - *lamina propria* a submukóza obsahují mírný zánětlivý infiltrát
 - regenerace povrchového epitelu - u méně než 5 % všech krypt
- **4. stupeň**
 - časná hyperplazie epitelu – u méně než 2/3 všech krypt
 - ztráta mucinu
 - *lamina propria* a submukóza obsahují výrazný zánětlivý infiltrát

3.2.10.2 Stanovení produkce mucinu v epitelích

Sekreci mucinu jsme hodnotili zařazením do jedné ze čtyř následujících kategorií:

- **1. stupeň**
 - hlenotvorba v epitelích zachována v rozsahu 25 %

- **2. stupeň**
 - hlenotvorba v epiteliích zachována v rozsahu 50 %

- **3. stupeň**
 - hlenotvorba v epiteliích zachována v rozsahu 75 %

- **4. stupeň**
 - hlenotvorba v epiteliích zachována v rozsahu 100 %

3.3 Vyjádření výsledků

Hladiny cytokinů v supernatantech po kultivaci slezinných buněk a buněk MLU jsou vyjádřeny jednotkou pikogram na mililitr (pg/ml). Hladiny cytokinů v supernatantech po kultivaci střevních kousků jsou vyjádřeny jednotkou pikogram na 10 miligramů tkáně (pg/10 mg). Výsledky jsou zaznamenány v tabulkách a grafech jako průměry ± SEM (Standard Error of the Mean, standardní chyba průměru) hodnot získaných od myší v jednotlivých experimentálních skupinách.

Označíme-li hodnoty veličin ve výběrovém souboru jako x_1, x_2, \dots, x_n , pak jsou definovány:

- rozsah výběrového souboru jako počet jeho prvků n

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

- výběrový průměr vztahem

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

- výběrová směrodatná odchylka

$$SEM = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

- standardní chyba průměru

(Klemera a Klemerová, 1999).

Pouze v případě stanovení cytokinů v supernatantech po kultivaci buněk MLU jsou výsledky zaznamenány jako absolutní hodnoty získané od experimentálních skupin myší, protože vzorky v jednotlivých skupinách byly spojeny.

Statisticky signifikantní rozdíly mezi experimentálními skupinami v porovnání s kontrolami byly hodnoceny Studentovým *t* testem a analýzou rozptylu při jednoduchém třídění (ANOVA 1 faktor). Hladina významnosti $P < 0,05$ byla považována za statisticky signifikantní, a to sice:

- # statisticky signifikantní ($P < 0,05$) (skupina 1 *versus* skupina 2);
- * statisticky signifikantní ($P < 0,05$) (skupina 1 *versus* skupina 3);
- ** statisticky signifikantní ($P < 0,005$) (skupina 1 *versus* skupina 3).

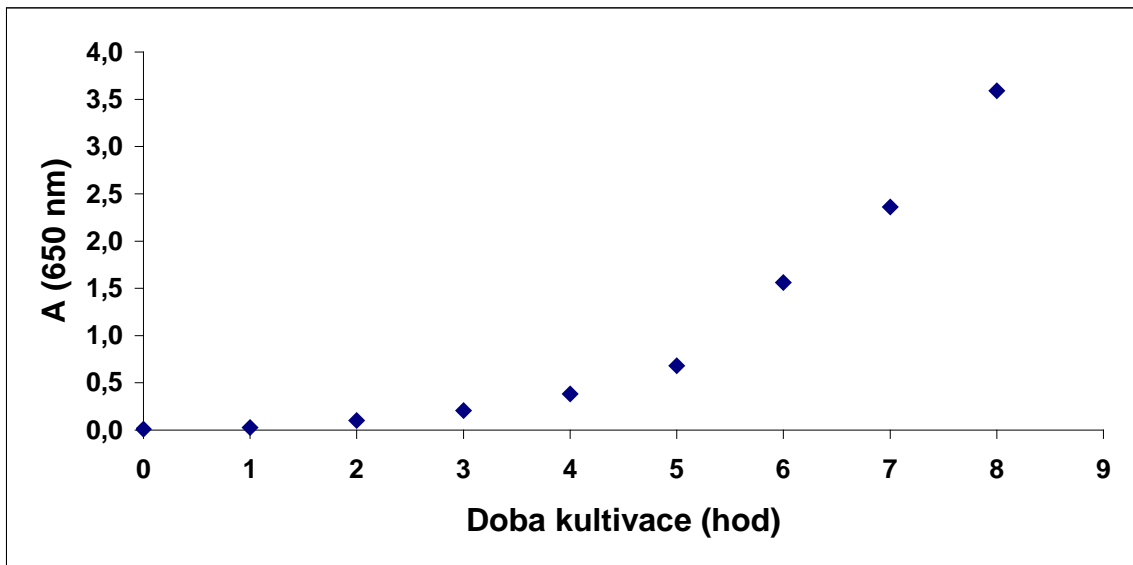
4 Výsledky

4.1 Růstová křivka bakterie

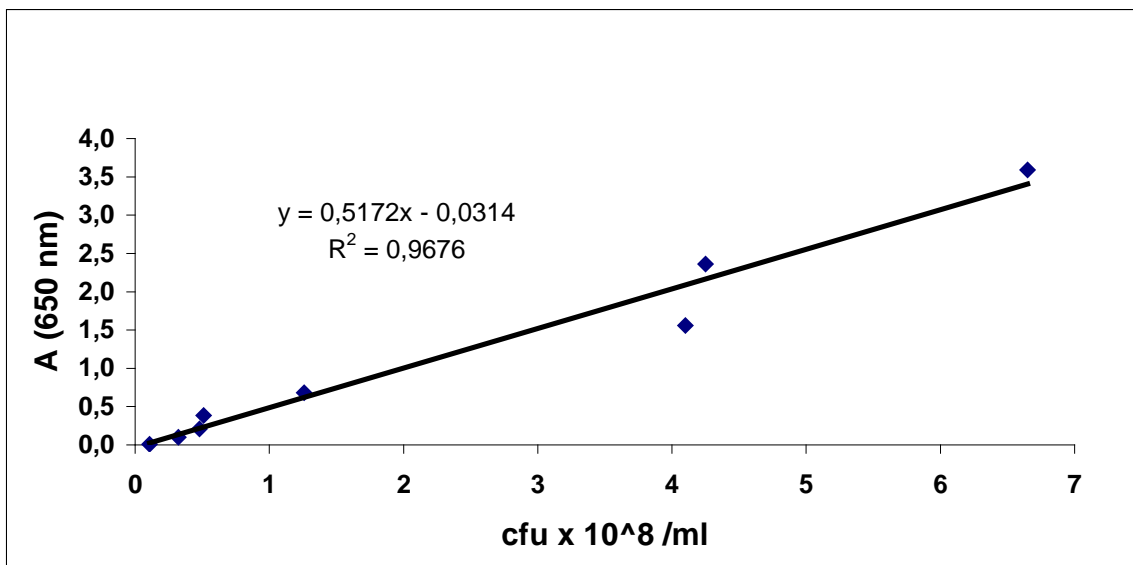
Získanou hodnotu korelace mezi absorbancí a počtem bakterií jsme využili pro stanovení vhodné koncentrace pro testování jejich probiotických účinků u myšího modelu zánětu střeva. Dosažené výsledky jsou uvedeny v tabulce 4 a jsou vyneseny do grafů na obrázku 7 (závislost A_{650} na době kultivace) a na obrázku 8 (závislost A_{650} na cfu/ml). K sondování myší jsme použili bakterie v exponenciální fázi růstu.

Tabulka 4 - Změna počtu buněk a absorbance během kultivace kmene *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P v MRSC bujónu při 37 °C

Čas (hod)	A_{650}	Cfu x 10 ⁸ /ml
0	0,010	0,107
1	0,028	0,115
2	0,100	0,322
3	0,208	0,480
4	0,384	0,510
5	0,680	1,260
6	1,560	4,100
7	2,360	4,250
8	3,590	6,650



Obrázek 7 - Růstová křivka *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P (závislost absorbance měřené při 650 nm na délce kultivace buněčné kultury)



Obrázek 8 - Závislost absorbance (A_{650}) na počtu kolonií (cfu/ml) *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P

4.2 Klinické nálezy

Klinické nálezy zaznamenané u myší na konci pokusu po pětidenním podávání 3 % DSS v pitné vodě uvádí tabulka 5. Na základě vnějšího pozorování jsme zjistili, že u 1. skupiny (*Lb. paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P) ze 6 myší krvácela 1 myš. U 2. skupiny, která měla ověřit vliv MRSC média jako možného prebiotika, krvácely všechny 4 myši. U 3. skupiny (PBS) krvácely 3 myši z 5.

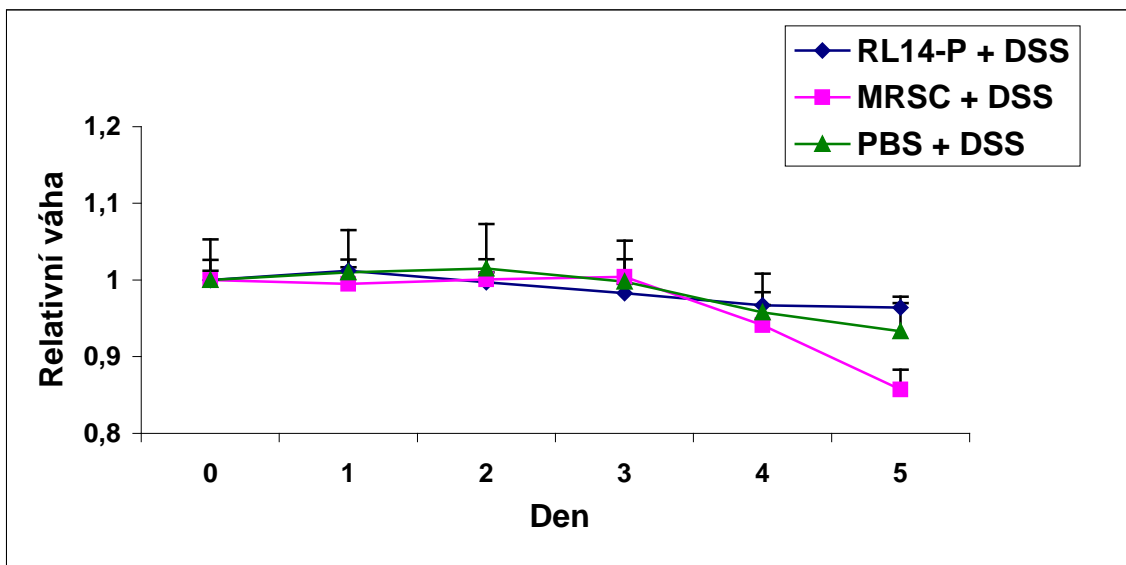
Sledování úbytku váhy myší během pokusu je zaznamenáno na obrázku 9. Myši 1. skupiny, které dostávaly *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P a DSS, téměř neubývaly na váze zejména oproti 2. skupině, která dostávala MRSC médium a DSS.

Na obrázku 10 jsou zaznamenány průměrné délky tlustého střeva myší v jednotlivých experimentálních skupinách. Tlusté střevo bylo u myší, které dostávaly *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P a DSS, signifikantně delší (průměr 9,25 cm) oproti druhým skupinám (MRSC médium - průměr 6,75 cm; kontrolní PBS - průměr 6,25 cm; $P < 0,005$).

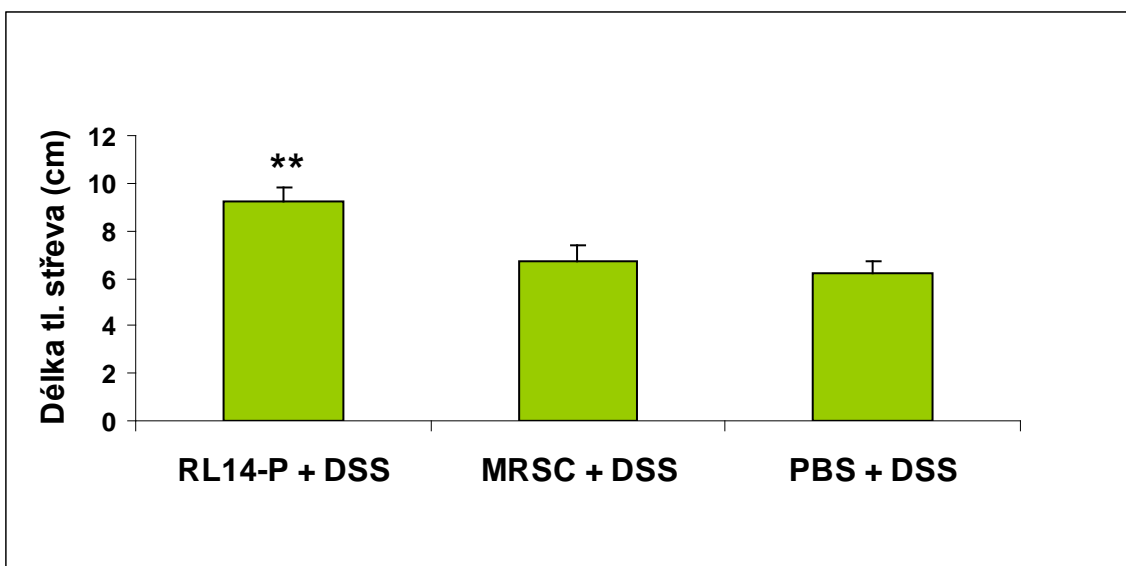
(Pro porovnání - normální délka tlustého střeva BALB/c myši odpovídajícího stáří, kterým nebyl podáván DSS, je 10-11 cm).

Tabulka 5 – Klinické nálezy zaznamenané u myší po pětidenním podávání 3 % DSS v pitné vodě

Skupina 1 <i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> RL14-P + DSS	Vnější pozorování
1	Nekrvácí
2	Nekrvácí
3	Nekrvácí
4	Nekrvácí
5	Krvavý průjem, krev v tlustém střevě
6	Nekrvácí
Skupina 2 MRSC médium + DSS	Vnější pozorování
7	Průjem, krev v tlustém střevě
8	Průjem, krvácí z rekta, krev v tlustém střevě a slepém střevě
9	Krvácí z rekta, krev v tlustém střevě
10	Krev v tlustém střevě a slepém střevě
Skupina 3 PBS + DSS (kontroly)	Vnější pozorování
11	Krvácí z rekta, krev v tlustém střevě
12	Krvácí z rekta
13	Nekrvácí
14	Krvácí z rekta, krev v tlustém střevě
15	Nekrvácí



Obrázek 9 - Relativní úbytek váhy myši během pětidenního podávání 3 % DSS v pitné vodě



Obrázek 10 - Průměrné délky tlustého střeva myši v experimentálních skupinách po pětidenním podávání 3 % DSS v pitné vodě

**statisticky signifikantní ($P < 0,005$) (RL14-P + DSS vs. PBS + DSS)

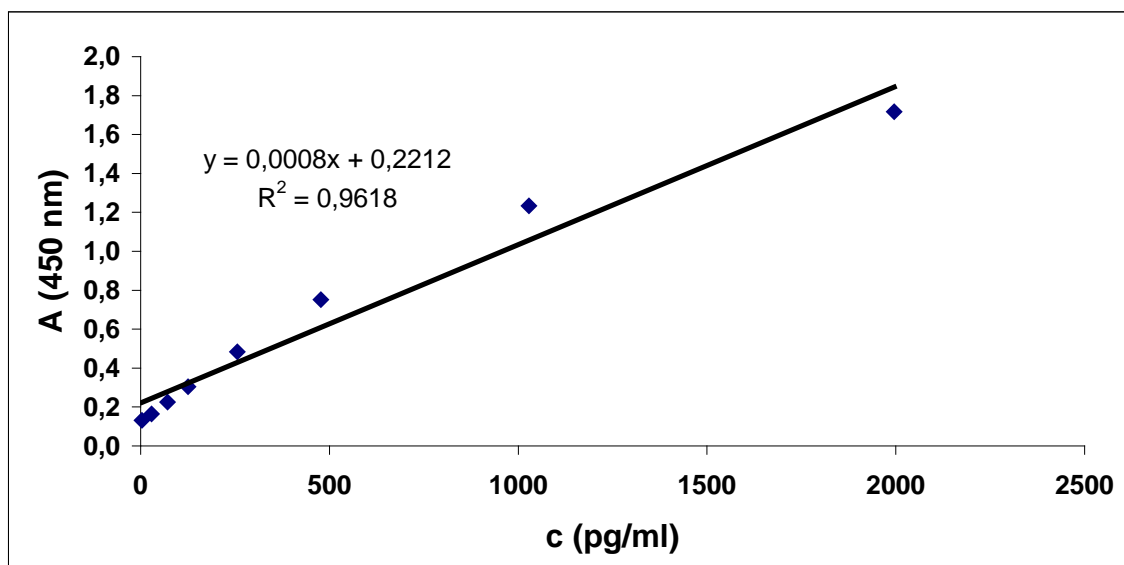
4.3 Stanovení cytokinů v supernatantech po kultivaci slezinných buněk a buněk mezenterálních lymfatických uzlin

Metodou ELISA jsme stanovili prozánětlivé cytokiny - TNF- α a IL-6 a protizánětlivý cytokin IL-10. Kalibrační křivky pro stanovení cytokinů jsou na obrázcích 11 a 15.

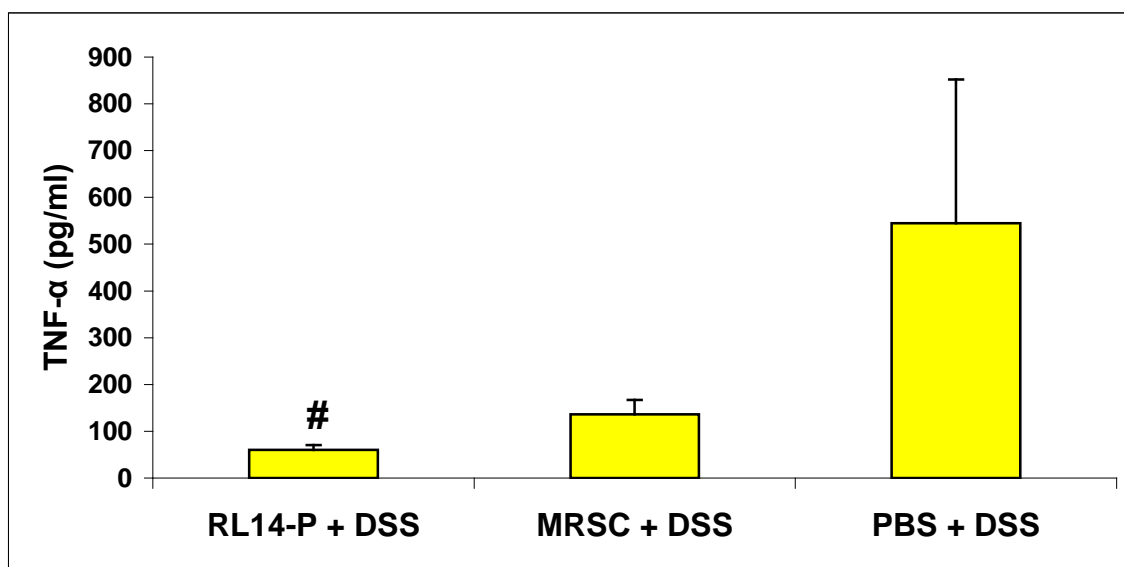
Hladina TNF- α stanovená v supernatantech po kultivaci slezinných lymfocytů (*in vitro* nestimulovaných) byla poměrně nízká, nejnižší je u 1. skupiny (*Lb. paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P) (viz. obrázek 12). Hladiny TNF- α v supernatantech slezinných lymfocytů restimulovaných *in vitro* formolizovanou bakterií nebyly signifikantně odlišné (viz. tabulka 6). V supernatantech po kultivaci MLU *in vitro* nestimulovaných buněk byla hladina TNF- α nejvyšší u 1. skupiny (viz. obrázek 13). Na druhé straně v supernatantech po kultivaci MLU stimulovaných *in vitro* formolizovanými laktobacily byla hladina TNF- α v 1. skupině nejnižší (viz. obrázek 14).

Hladina druhého prozánětlivého cytokinu IL-6 byla na hranici detekovatelnosti (viz. tabulka 6).

V supernatantech po kultivaci slezinných lymfocytů a MLU *in vitro* nestimulovaných anebo stimulovaných formolizovaným *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P jsme stanovili protizánětlivý cytokin IL-10. Hladiny IL-10 v supernatantech slezinných lymfocytů nebyly signifikantně ovlivněny (viz. obrázek 16 a 17), zatímco jsme pozorovali výraznou stimulaci IL-10 jak u *in vitro* nestimulovaných (viz. obrázek 18), tak u *in vitro* stimulovaných (viz. obrázek 19) buněk MLU ve skupině 1, kde myši dostávaly *in vivo* *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P.

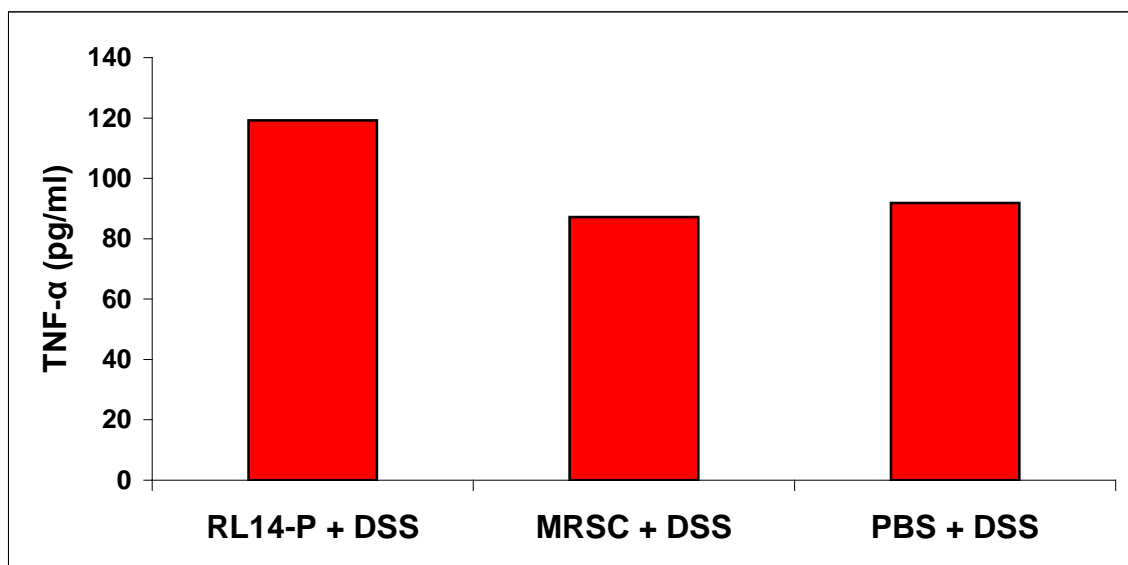


Obrázek 11 - Kalibrační křivka pro stanovení cytokinu TNF- α v supernatantech po kultivaci slezinných lymfocytů a buněk mezenterálních lymfatických uzlin (závislost absorbance měřené při 450 nm na koncentraci cytokinu TNF- α)

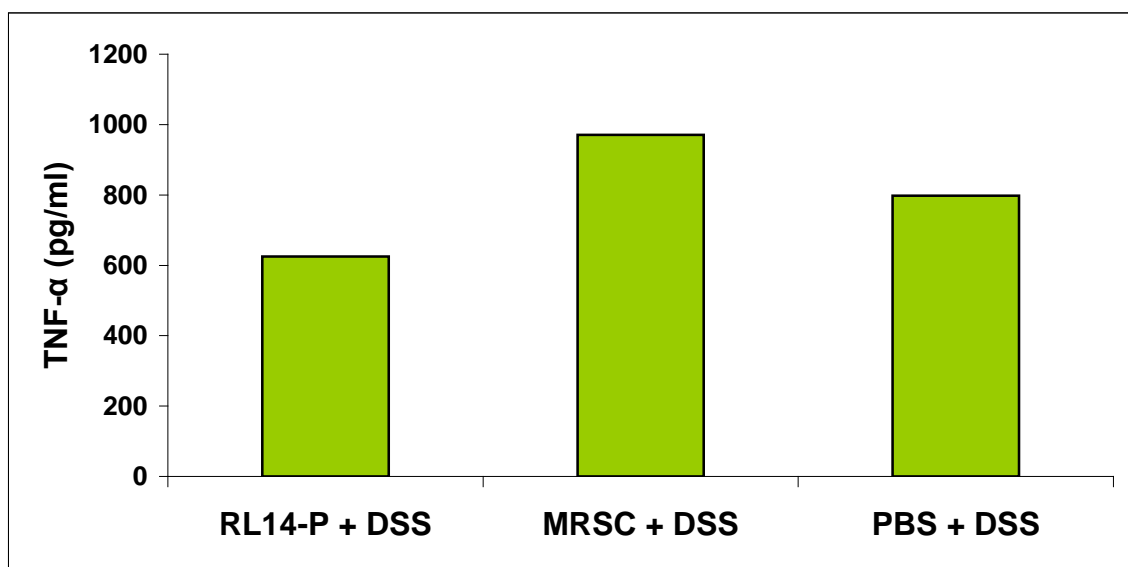


Obrázek 12 - Hladiny TNF- α (pg/ml) stanovené v supernatantech po kultivaci slezinných lymfocytů (*in vitro* nestimulovaných)

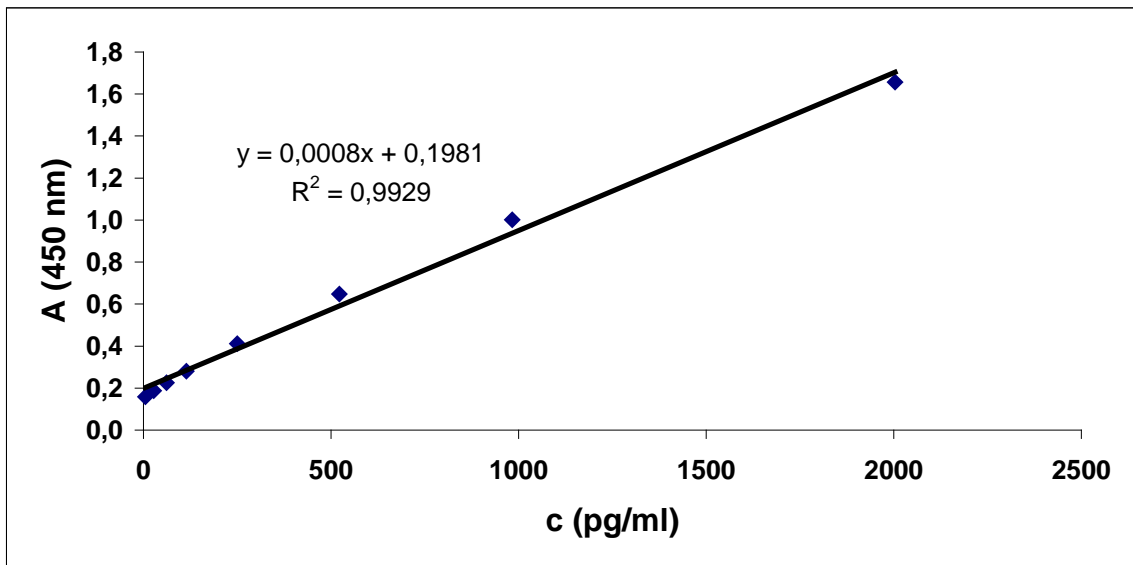
#statisticky signifikantní (P < 0,05) (RL14-P + DSS vs. MRSC + DSS)



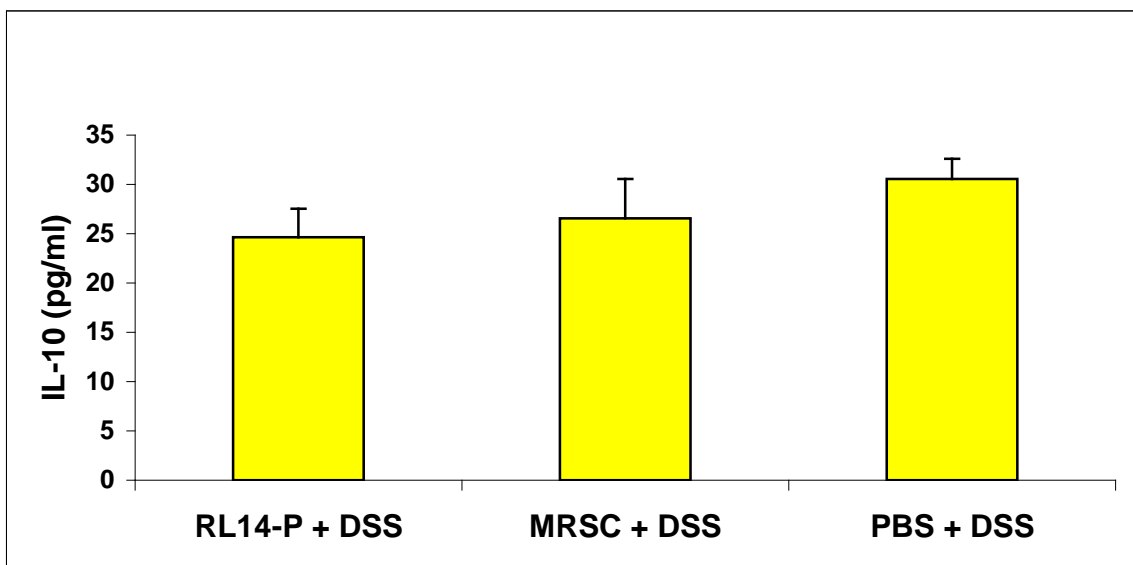
Obrázek 13 - Hladiny TNF- α stanoveré v supernatantech po kultivaci buněk mezenterálních lymfatických uzlin (*in vitro* nestimulovaných)



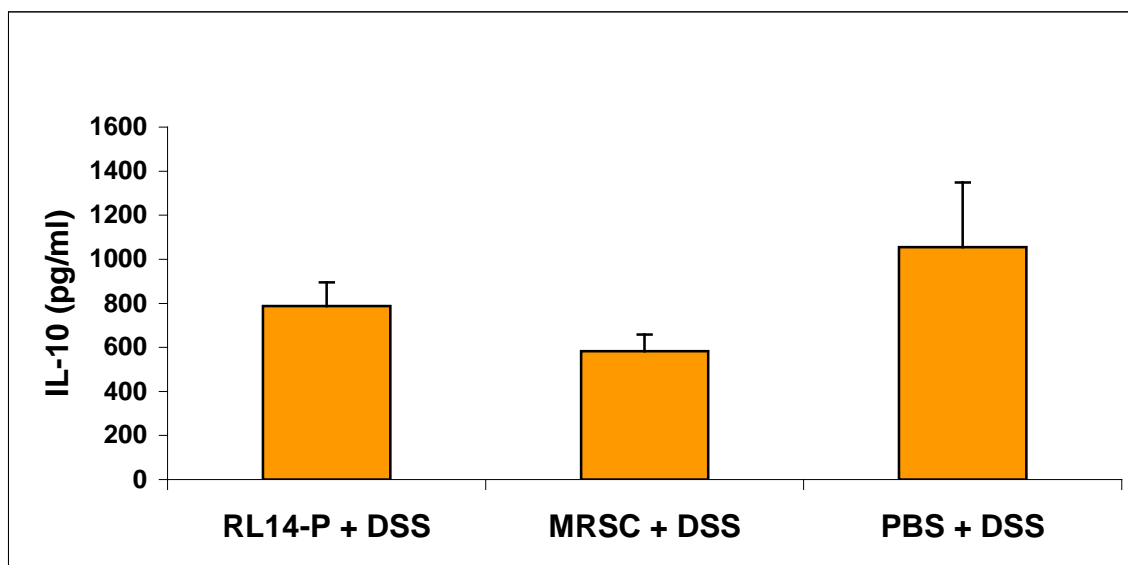
Obrázek 14 - Hladiny TNF- α stanoveré v supernatantech po kultivaci buněk mezenterálních lymfatických uzlin (*in vitro* restimulovaných formolizovaným *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P)



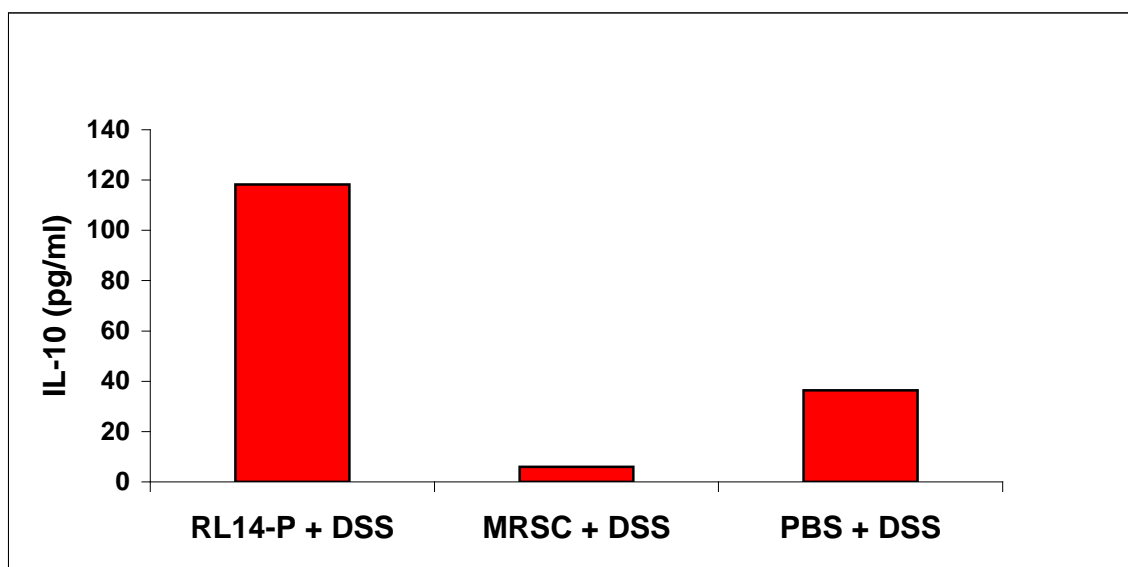
Obrázek 15 – Kalibrační křivka pro stanovení cytokinu IL-10 v supernatantech po kultivaci slezinných lymfocytů a buněk mezenterálních lymfatických uzlin (závislost absorbance měřené při 450 nm na koncentraci cytokinu IL-10)



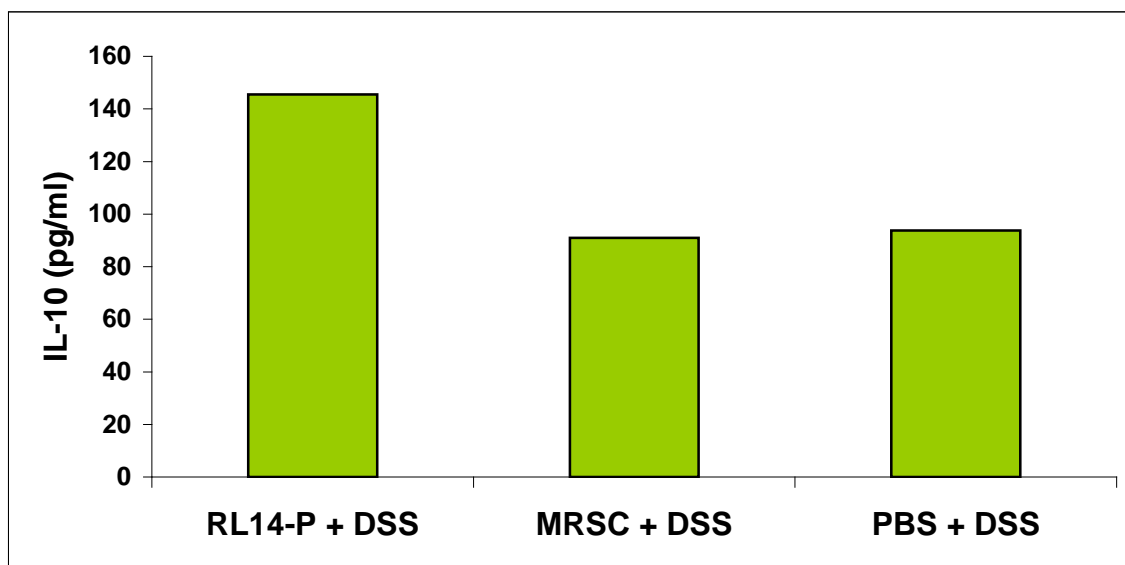
Obrázek 16 - Hladiny IL-10 stanovené v supernatantech po kultivaci slezinných lymfocytů (*in vitro* nestimulovaných)



Obrázek 17 - Hladiny IL-10 stanovené v supernatantech po kultivaci slezinných lymfocytů (*in vitro* restimulovaných formolizovaným *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P)



Obrázek 18 - Hladiny IL-10 stanovené v supernatantech po kultivaci buněk mezenterálních lymfatických uzlin (*in vitro* nestimulovaných)



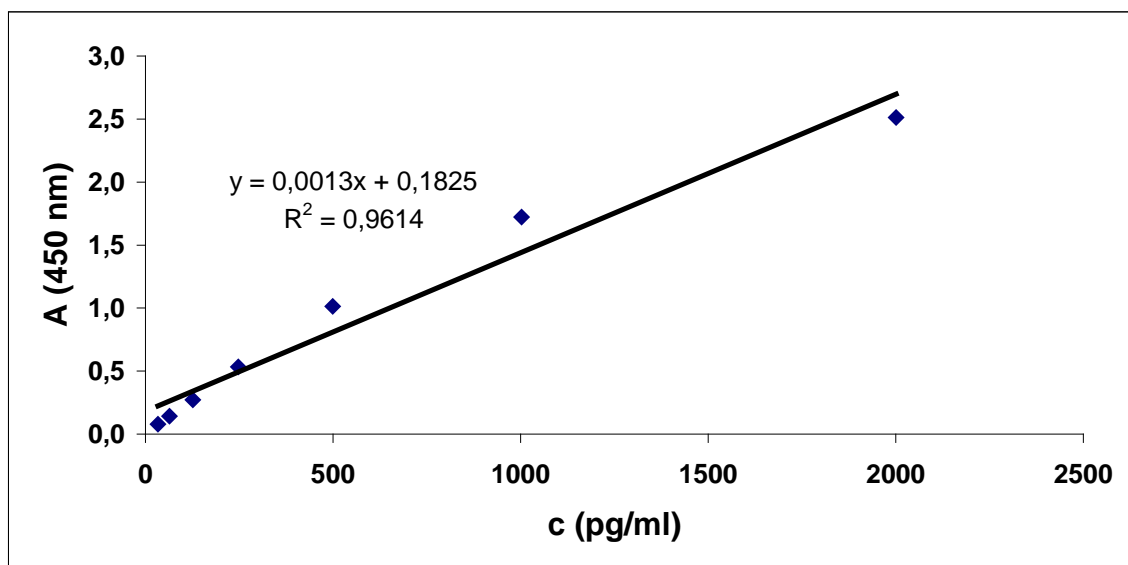
Obrázek 19 - Hladiny IL-10 stanovené v supernatantech po kultivaci buněk mezenteriálních lymfatických uzlin (*in vitro* restimulovaných formolizovaným *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P)

4.4 Stanovení cytokinů v supernatantech po kultivaci střevních kousků

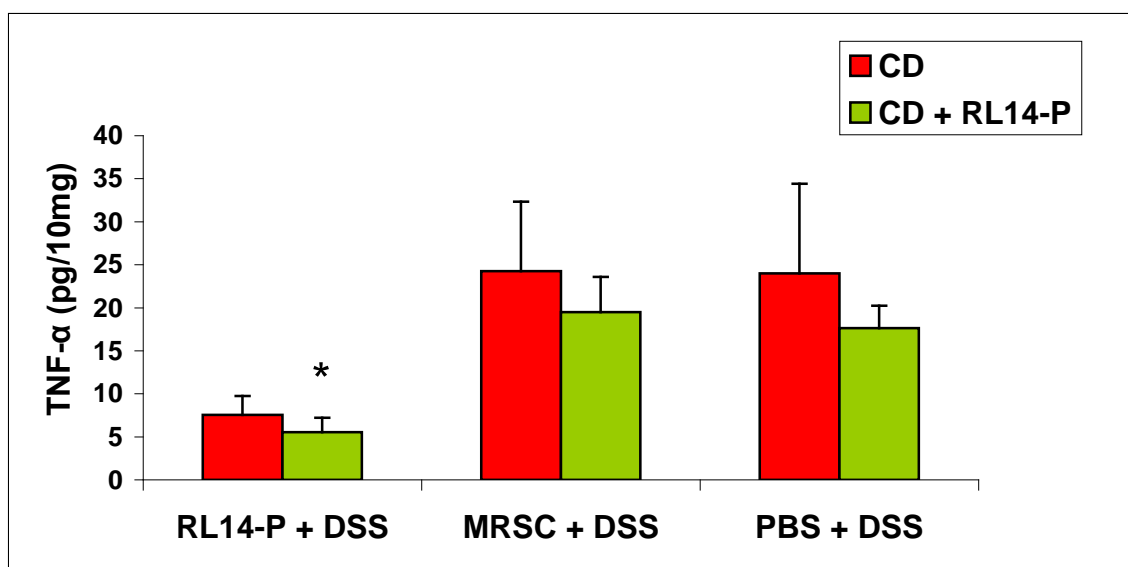
Cytokiny jsme stanovili v supernatantech po 48hodinové kultivaci střevních kousků *colon ascendens* a *colon descendens* metodou ELISA. Kalibrační křivky pro jednotlivá stanovení cytokinů jsou uvedené na obrázcích 20, 22 a 24.

Zjistili jsme, že hladiny cytokinů v supernatantech po kultivaci tkáně z *colon ascendens* nebyly signifikantně odlišné (viz. tabulka 6).

Hladina TNF- α , IL-6 a IL-10 v supernatantech po kultivaci tkáně z *colon descendens*, kde se nejvíce projevují zánětlivé změny vyvolané podáváním DSS, byla výrazně redukována u 1. skupiny myší (*Lb. paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P) a to jak u *in vitro* nestimulovaných, tak u vzorků stimulovaných *in vitro* formolizovanými laktobacily (viz. obrázky 21, 23 a 25).

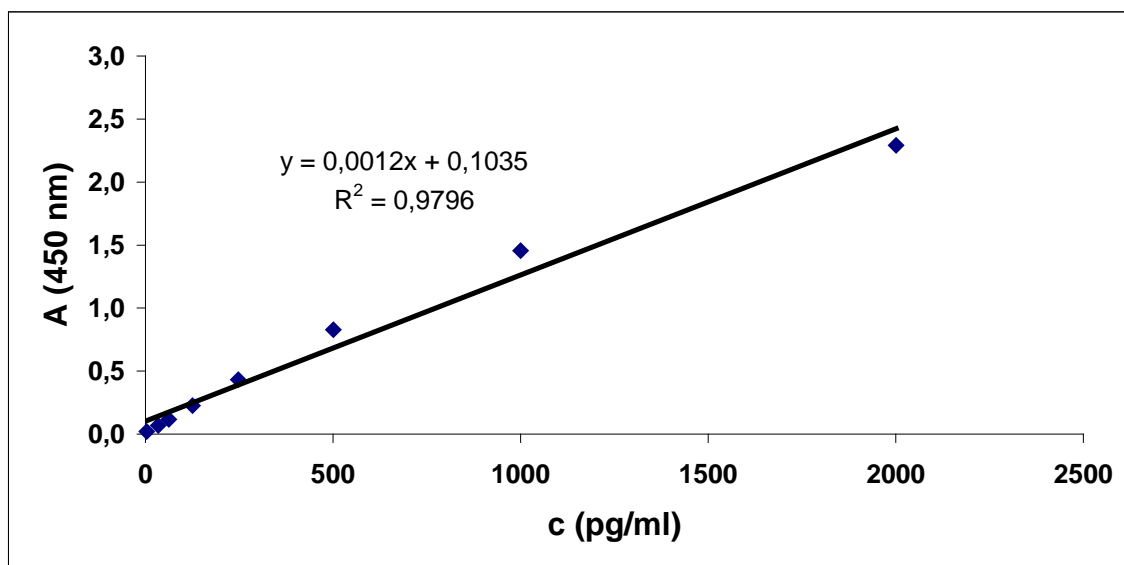


Obrázek 20 - Kalibrační křivka pro stanovení cytokinu TNF- α v supernatantech po kultivaci střevních kousků (závislost absorbance měřené při 450 nm na koncentraci cytokinu TNF- α)

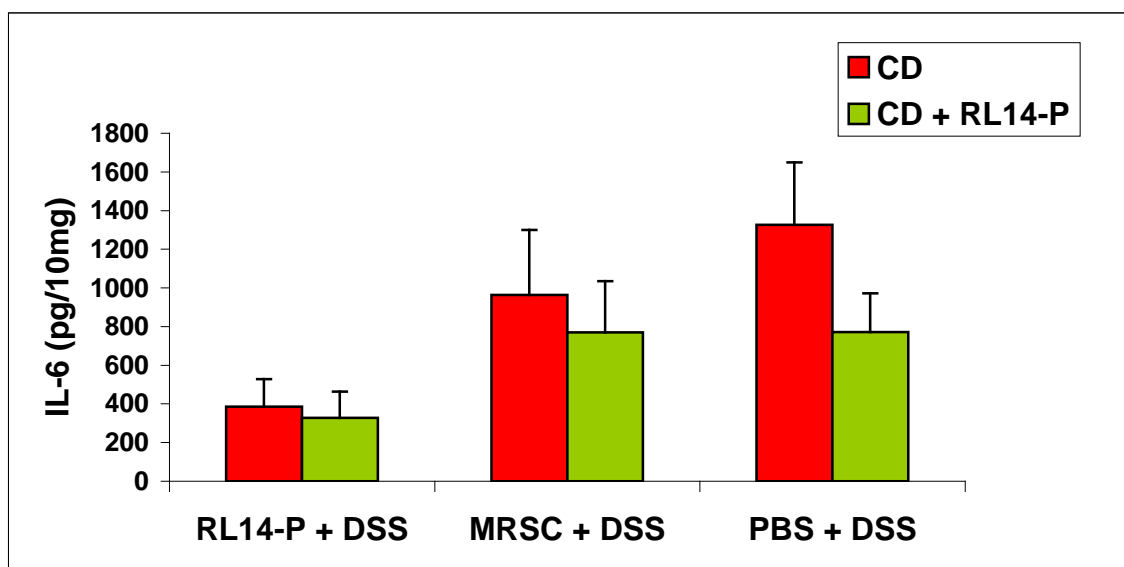


Obrázek 21 - Hladiny TNF- α (pg/10 mg) v supernatantech po kultivaci tkáně z *colon descendens* (CD) (červené sloupce – *in vitro* nestimulované a zelené sloupce *in vitro* restimulované vzorky formolizovaným *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P)

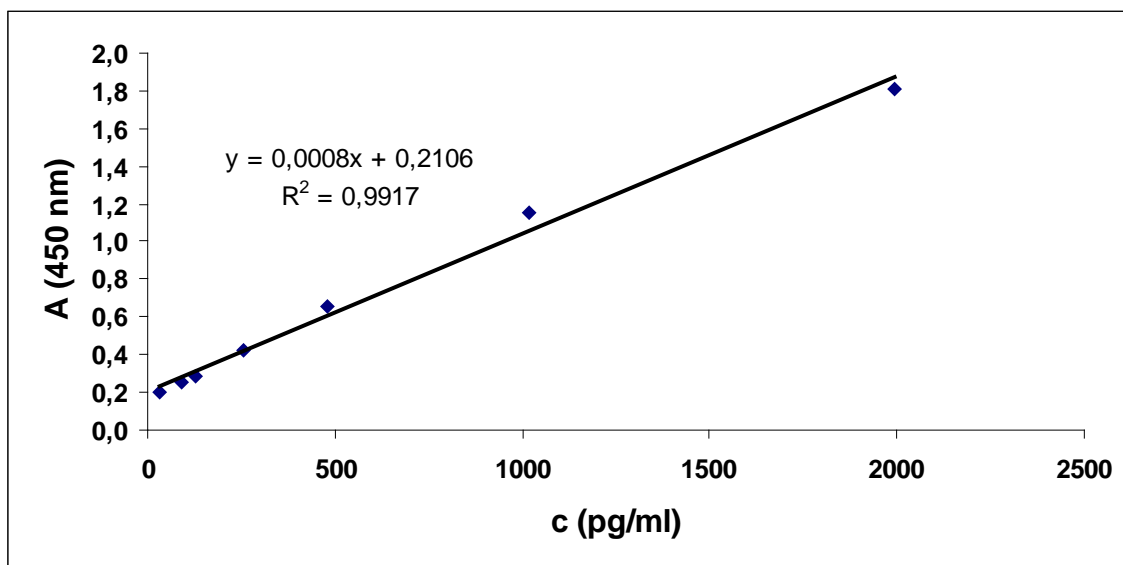
*statisticky signifikantní ($P < 0,05$) (RL14-P + DSS vs. PBS + DSS)



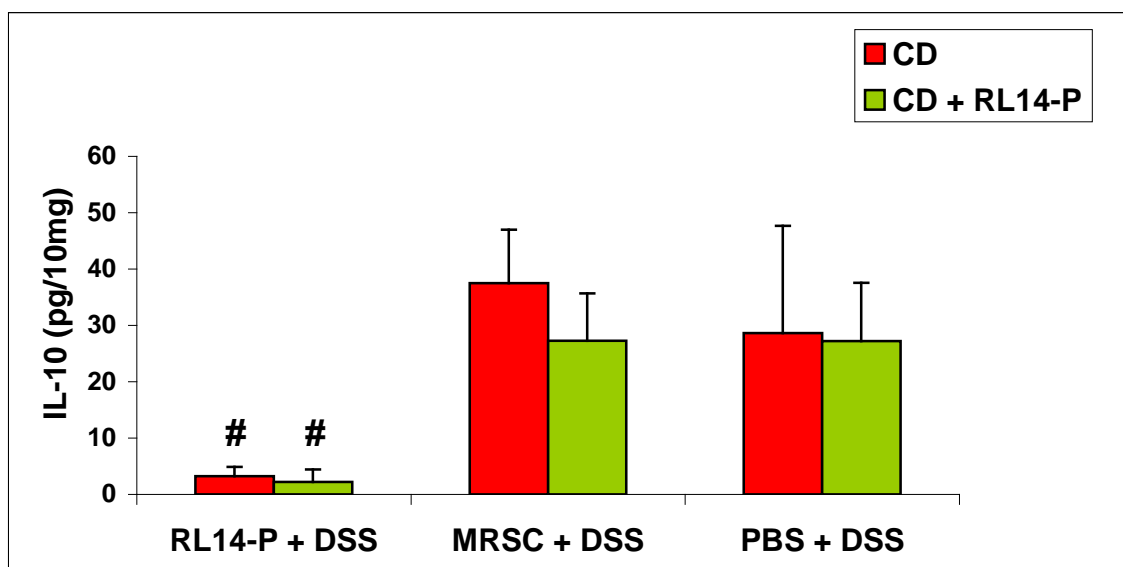
Obrázek 22 - Kalibrační křivka pro stanovení cytokinu IL-6 v supernatantech po kultivaci střevních kousků (závislost absorbance měřené při 450 nm na koncentraci cytokinu IL-6)



Obrázek 23 - Hladiny IL-6 (pg/10 mg) v supernatantech po kultivaci tkáně z *colon descendens* (CD) (červené sloupce – *in vitro* nestimulované a zelené sloupce *in vitro* restimulované vzorky formolizovaným *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P)



Obrázek 24 - Kalibrační křivka pro stanovení cytokinu IL-10 v supernatantech po kultivaci střevních kousků (závislost absorbance měřené při 450 nm na koncentraci cytokinu IL-10)



Obrázek 25 - Hladiny IL-10 (pg/10 mg) v supernatantech po kultivaci tkáně z *colon descendens* (CD) (červené sloupce – *in vitro* nestimulované a zelené sloupce *in vitro* restimulované vzorky formolizovaným *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P)

#statisticky signifikantní (P < 0,05) (RL14-P + DSS vs. MRSC + DSS)

Tabulka 6 - Souhrnná tabulka stanovení cytokinů^a

Cytokin		Skupina 1 (RL14-P + DSS)		Skupina 2 (MRSC + DSS)		Skupina 3 (PBS + DSS)	
		nestimulovaný vzorek	<i>in vitro</i> restim. RL14-P	nestimulovaný vorek	<i>in vitro</i> restim. RL14-P	nestimulovaný vzorek	<i>in vitro</i> restim. RL14-P
TNF- α	Sleziny	60,22 \pm 10,51	3990,75 \pm 288,61	136,26 \pm 30,75	3443,53 \pm 421,17	544,99 \pm 306,81	4212,92 \pm 673,00
	MLU ^b	119,16	624,75	87,16	970,35	91,83	798,25
	CA ^c	9,89 \pm 2,83	8,00 \pm 0,82	8,35 \pm 1,43	7,04 \pm 0,57	11,42 \pm 0,99	7,24 \pm 0,63
	CD ^d	7,55 \pm 2,19	5,55 \pm 1,67	24,28 \pm 8,08	19,49 \pm 4,11	24,00 \pm 10,42	17,65 \pm 2,60
IL-10	Sleziny	24,66 \pm 2,87	788,28 \pm 106,65	26,54 \pm 4,00	583,19 \pm 75,47	30,54 \pm 2,07	1055,02 \pm 294,24
	MLU	118,27	145,56	5,94	90,94	36,38	93,71
	CA	20,08 \pm 3,31	13,91 \pm 5,90	14,65 \pm 3,42	15,03 \pm 3,80	18,41 \pm 1,55	15,97 \pm 2,95
	CD	3,21 \pm 1,67	2,21 \pm 2,21	37,49 \pm 9,51	27,29 \pm 8,41	28,64 \pm 19,04	27,20 \pm 10,35
IL-6	Sleziny	7,93 \pm 3,90	868,26 \pm 71,63	0	533,59 \pm 87,49	43,88 \pm 27,75	893,83 \pm 156,63
	MLU	58,70	137,91	0	79,05	0	159,12
	CA	427,58 \pm 300,30	143,05 \pm 102,29	426,47 \pm 384,42	260,00 \pm 137,74	371,37 \pm 221,00	61,14 \pm 13,18
	CD	358,18 \pm 142,89	327,17 \pm 135,74	964,11 \pm 335,28	770,58 \pm 264,54	1326,88 \pm 322,07	771,71 \pm 199,87

^a data jsou vyjádřena jako průměry \pm SEM (Standard Error of the Mean, standardní chyba průměru) hodnot získaných od myší v jednotlivých experimentálních skupinách, event. jako absolutní hodnoty získané od experimentálních skupin (viz. MLU)

^b mezenteriální lymfatické uzliny

^c *colon ascendens*

^d *colon descendens*

4.5 Histologické hodnocení zánětlivých změn tlustého střeva

Hodnocení stupně poškození střevní sliznice jsme provedli dle Coopera et al. (1993). 1. skupina myší, která dostávala *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P a DSS, vykazovala pouze mírné morfologické změny v oblasti *colon descendens*. Průměrné skóre poškození u 1. skupiny odpovídalo stupni 1-2 (viz. obrázek 26). U dvou zvířat z této skupiny jsme našli mírný zánět (viz. obrázek 27). Zjistili jsme normální produkci mucinu pohárkovými buňkami, který chrání střevní epitel před poškozením. Produkce mucinu v 1. skupině průměrně odpovídala stupni 3-4 (viz. obrázek 28).

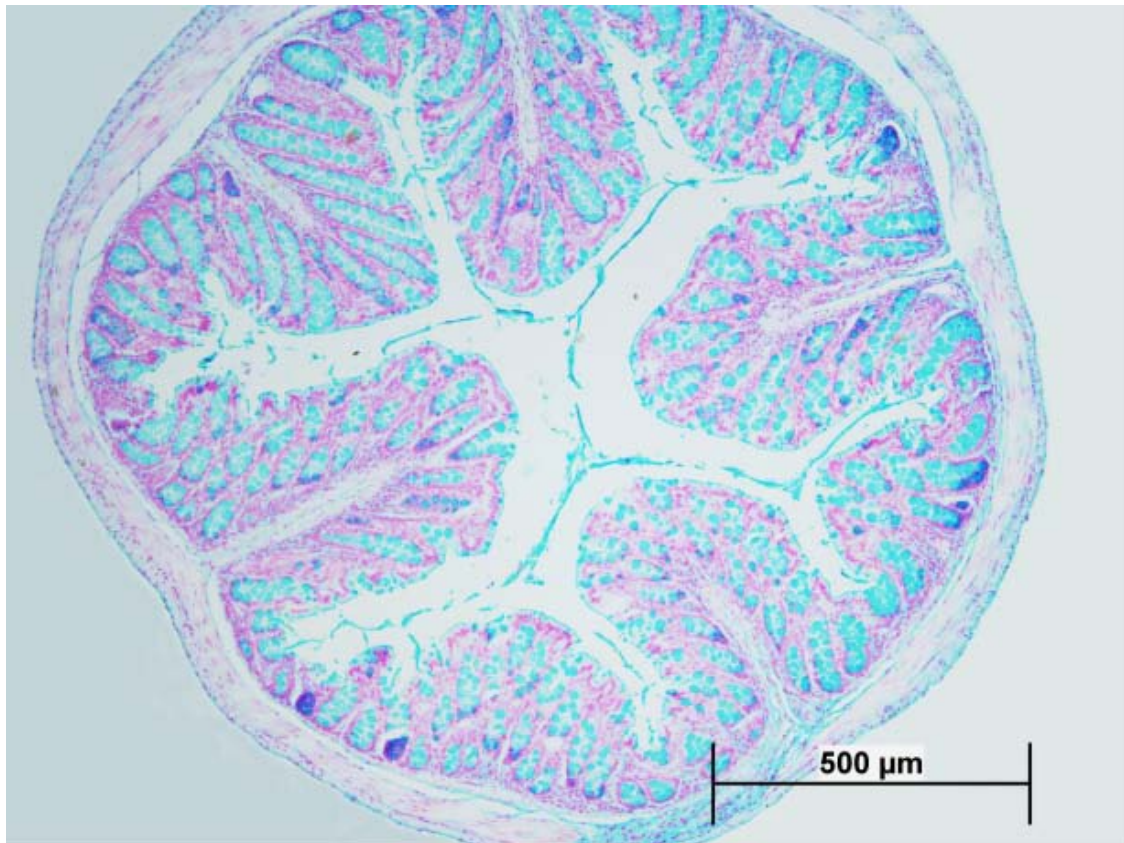
U druhých dvou skupin jsme zaznamenali výrazné zánětlivé změny sliznice v *colon descendens*. Průměrné poškození střevní sliznice v obou kontrolních skupinách jsme hodnotili stupněm 3-4 (viz. obrázek 29). Došlo k vymizení krypt a výrazné infiltraci zánětlivých buněk do *lamina propria*. U vzorků získaných z těchto skupin jsme zaznamenali sníženou produkci mucinu, což odpovídá snížení počtu pohárkových buněk. Průměrnou intenzitu produkce mucinu jsme hodnotili stupněm 2-3 (viz. obrázek 30).



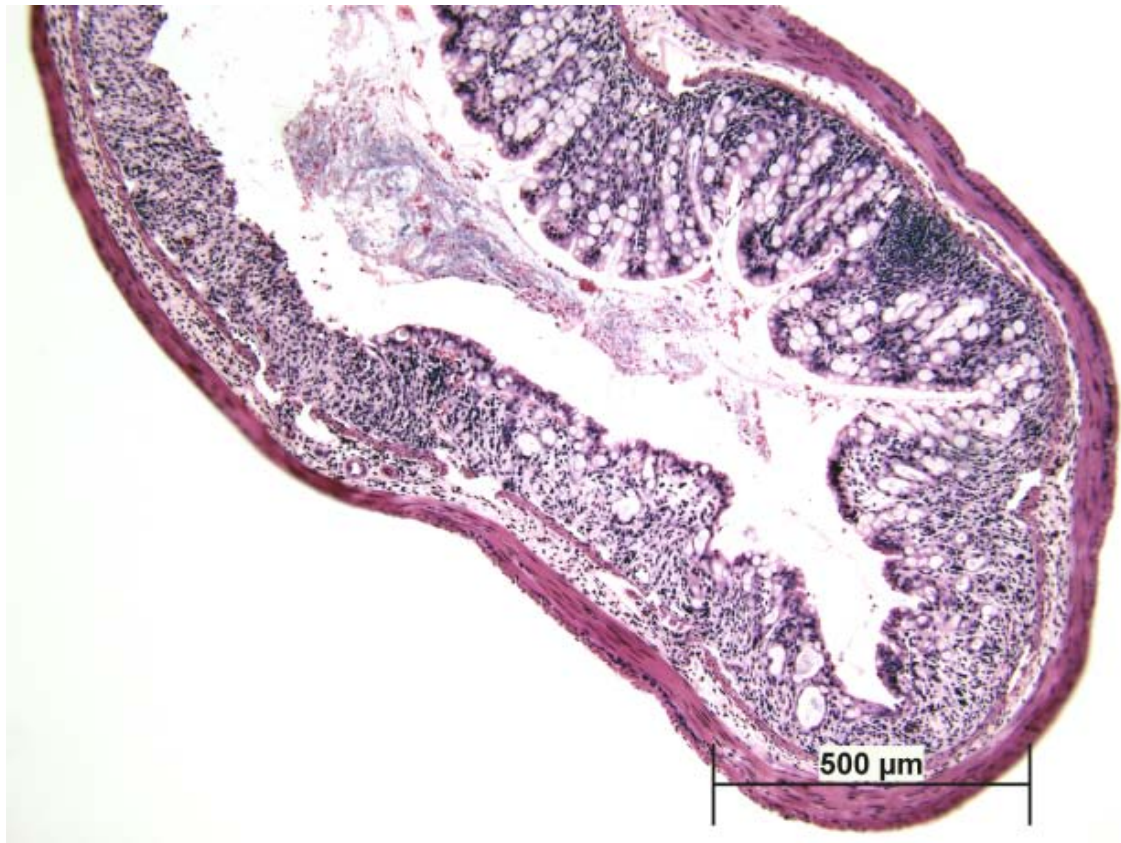
Obrázek 26 - Sliznice *colon descendens* u BALB/c myši po pětidenním podávání 3 % DSS spolu s i. g. podáváním *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P. Krypty, povrchový epitel a pohárkové buňky jsou beze změn. V *lamina propria* je patrná infiltrace zánětlivých buněk. Stupeň poškození podle Coopera et al. (1993) je 0-1. H&E barvený příčný řez.



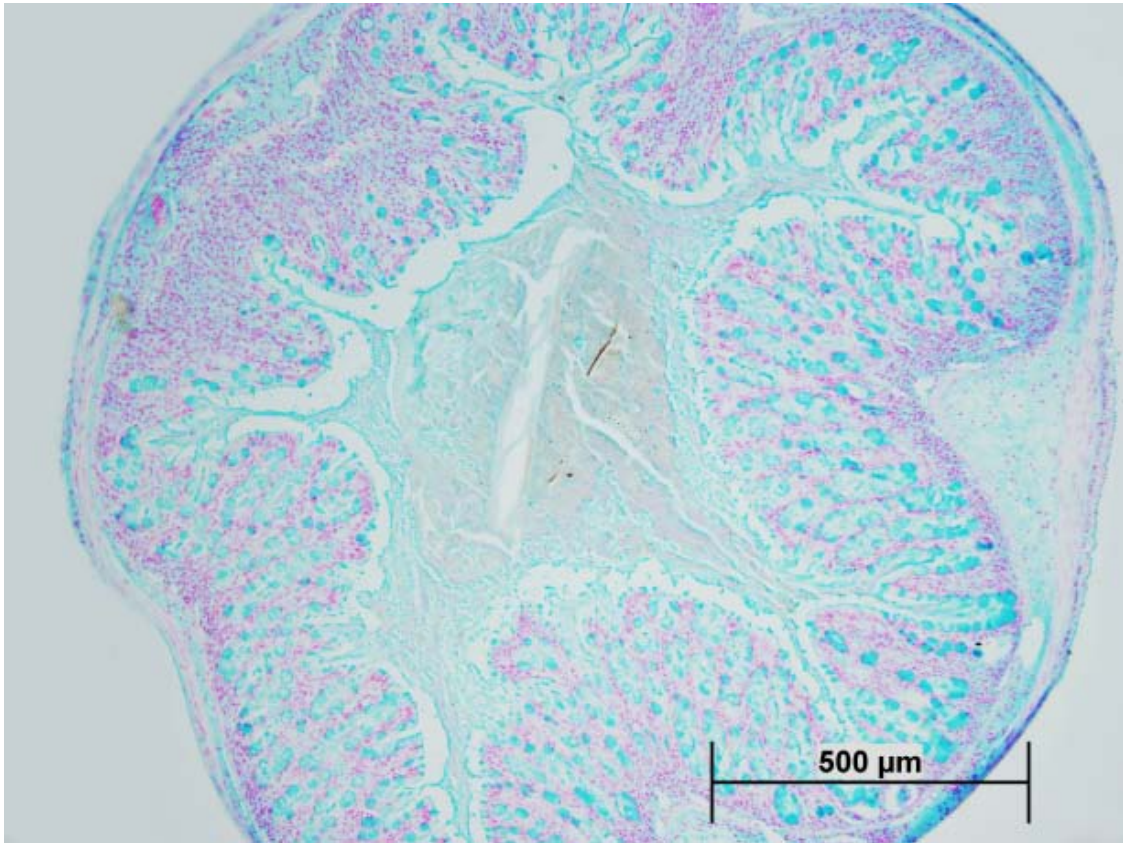
Obrázek 27 - Sliznice *colon descendens* u BALB/c myši po pětidenním podávání 3 % DSS spolu s i. g. podáváním *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P. Krypty, povrchový epitel a pohárkové buňky jsou na 70 % průřezu beze změn. Na 30 % průřezu je patrná výrazná infiltrace zánětlivých buněk a vymizení krypt. Podle Coopera et al. (1993) hodnoceno stupněm poškození 2. H&E barvený příčný řez.



Obrázek 28 - Sliznice *colon descendens* u BALB/c myši po pětidenním podávání 3 % DSS spolu s i. g. podáváním *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P. Pohárkové buňky jsou nepoškozené. Intenzita produkce mucinu je hodnocena stupněm 4. Alcianovou modří barvený příčný řez.



Obrázek 29 - Sliznice *colon descendens* u BALB/c myši po pětidenním podávání 3 % DSS spolu s i. g. podáváním MRSC média. Krypty zcela chybí. V *lamina propria* i submukóze se nachází infiltrace zánětlivých buněk. Místy je patrný defekt povrchového epitelu (vlevo nahoře). Na 50 % průřezu je stupeň poškození 4, na 50 % průřezu je stupeň poškození 3. Průměrný stupeň poškození podle Coopera et al. (1993) je 3-4. H&E barvený příčný řez.



Obrázek 30 - Sliznice *colon descendens* u BALB/c myši po pětidenním podávání 3 % DSS spolu s i. g. podáváním MRSC média. Na 50 % průřezu je patrné snížení počtu pohárkových buněk. Intenzita produkce mucinu hodnocena stupněm 2-3. Alciánovou modří barvený příčný řez.

5 Diskuze

Cílem naší studie bylo zjistit, zda nepatogenní bakterie *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P, která byla vybrána jako možné probiotikum, bude mít ochranný účinek na akutní střevní zánět vyvolaný u BALB/c myši podáváním dextransulfátu sodného v modelu lidské ulcerózní kolitidy.

Probiotické bakterie ovlivňují příznivě mikroflóru trávicího traktu. Stimulují produkci ochranných IgA protilátek, zlepšují neprostupnost střevní bariéry a vylučují protizánětlivé metabolity (Madsen, 2001; Hannify et al., 2004). Při analýze účinků *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P jsme se zaměřili hlavně na vyhodnocení histologické a imunitní odpovědi přímo ve střevě, kde zánět probíhá. Zatímco kontrolní myši, které *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P nedostávaly, vykazovaly typické znaky zánětu – průjem, krvácení z rektu a další doprovodné typické parametry poškození (úbytek na váze a zkrácení tlustého střeva), u myši, které dostávaly *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P, jsme tyto projevy zánětu nepozorovali. Myši byly ve výrazně lepším zdravotním stavu. Délka tlustého střeva u myši s laktobacily a DSS byla srovnatelná s délkou tlustého střeva zdravých myši stejného stáří, zatímco kontrolní myši bez laktobacilů a s DSS měly tlusté střevo signifikantně zkrácené. Podobný efekt na vývoj experimentálního zánětu měl i *Lactobacillus plantarum* DSM 9843 (Osman et al., 2004) a *Lactobacillus casei* DN 114001 (Kokešová et al., 2006). Ne všechny laktobacily však mají ochranný účinek při střevních zánětech. Jejich účinnost je přísně kmenově specifická. V další studii byl porovnáván vliv tří bakterií mléčného kvašení na střevní zánět u myšního modelu TNBS indukované akutní kolitidy (Daniel et al., 2006). Autoři zjistili, že podávání *Lactobacillus salivarius* Ls-33 experimentálním myším mělo signifikantní protizánětlivý účinek, bakterie *Lactobacillus casei* BL23 a *Lactobacillus paracasei* IPL111 zmírnily střevní zánět ve srovnání s kontrolními myši, kdežto podávání bakterií *Lactobacillus plantarum* Lp-115 a *Lactobacillus acidophilus* NCFM vzniku kolitidy nezabránilo.

Při histologickém hodnocení *colon descendens* jsme zaznamenali, že k určitým zánětlivým změnám došlo i u třetiny myši, které dostávaly *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P a DSS. Ve střevní sliznici jsme pozorovali infiltraci zánětlivých buněk, ale struktura střeva byla u těchto myši zachovalá.

Průměrné skóre poškození střevní sliznice u 1. skupiny myší dle Coopera et al. (1993) odpovídalo stupni 1-2. Produkce mucinu jako znaku zachovalosti pohárkových buněk zůstala beze změn. Schultz et al. (2004) uvádí, že hlavním histologickým parametrem při akutní DSS kolitidě je spíše než infiltrace zánětlivých buněk destrukce architektury sliznice, která je způsobená primárním toxickým účinkem DSS. To by mohlo vysvětlit počínající morfologické zánětlivé změny u třetiny myší, kterým jsme podávali laktobacily. Tyto myši však z makroskopického hlediska byly ještě v dobrém zdravotním stavu. U kontrolních myší, které nedostávaly během pití DSS laktobacily, jsme ale našli výrazné poškození střevní sliznice s vymizením střevních krypt a pohárkových buněk, a tím i nižší produkci ochranného mucinu. Z našich výsledků vyplývá, že podávání probiotické bakterie spolu s DSS zmírnilo zánět u myší o dva stupně dle Cooperovy stupnice a o jeden stupeň zvýšilo produkci ochranného mucinu pohárkovými buňkami ve srovnání s kontrolami. Signifikantně mírnější zánět sliznice tlustého střeva byl pozorován u myší, kterým byla podávána společně s DSS probiotická bakterie *Lactobacillus casei* DN 114001 (Kokešová et al., 2006). Pokud byly bezmikrobní myši monokolonizovány probiotickou bakterií *E. coli* Nissle 1917 a byl jim podáván DSS, byly před morfologickými změnami střevní sliznice zcela ochráněny (Hudcovic et al., 2007).

Vliv probiotik na imunitní systém hostitele bývá hodnocen podle jejich vlivu na cytokinovou produkci zejména z hlediska potlačení produkce prozánětlivých cytokinů, jakými jsou TNF- α , IFN- γ , IL-6 a IL-8 (Pavan et al., 2003; Ewaschuk a Dieleman, 2006). Cytokin TNF- α hraje klíčovou roli v patogenezi IBD, kde je primárním mediátorem imunitní stimulace a odpovědi na zánět. Patofyziologickou roli hraje také IL-6, jehož produkce je u IBD pacientů stimulována (Mudter a Neurath, 2007). V naší studii jsme se proto zaměřili na vyhodnocení hladin cytokinů přímo ve střevě. V supernatantech po 48hodinové kultivaci kousků *colon descendens* jsme stanovili TNF- α a IL-6. Zjistili jsme, že u myší, kterým jsme podávali laktobacily, došlo k signifikantně snížené produkci těchto prozánětlivých cytokinů v porovnání s kontrolními myši, kterým byl místo *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P aplikován fosfátový pufr. Nedávné studie ukázaly, že *ex vivo* produkce prozánětlivého cytokinu TNF- α ve sliznicích tenkého střeva, které byly odebrané od pacientů s CD, byla

snížená v přítomnosti *Lactobacillus casei* (Hanniffy et al., 2004). Podobně Matsumoto et al. (2005) ve své studii uvádí, že aplikace bakterie *Lactobacillus casei* kmene Shirota experimentálním BALB/c myším, kterým byla podáváním DSS vyvolána chronická kolitida, snížila hladinu IL-6 produkovanou mononukleárními buňkami *lamina propria* tlustého střeva. Byly popsány protizánětlivé účinky *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* spojené s poklesem hladiny prozánětlivých cytokinů ve střevní sliznici myší (Peran et al., 2005). Je to proto, že podávání některých probiotik podporuje vyplavování protizánětlivých cytokinů IL-10 a TGF- β (Steidler et al., 2000; Hanniffy et al., 2004), a ty pak inhibují tvorbu prozánětlivých cytokinů TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-8 a IL-12 (Mach, 2006; Ewaschuk a Dieleman, 2006).

V naší studii byla hladina protizánětlivého cytokinu IL-10, která byla stanovena v supernatantech po 48hodinové kultivaci kousků *colon descendens*, signifikantně nejnižší u myší, které dostávaly probiotické bakterie. Domníváme se, že zvýšená produkce IL-10 u myší se střevním zánětem je spojena s obrannými mechanizmy organismu. Zánět vyvolal infiltraci imunitních buněk, hlavně makrofágů, a ty aby ochránily zánětlivou tkáň, zvýšily produkci IL-10 (Brandtzaeg et al., 1989). Na druhé straně ve tkáni, která zánětem poškozená nebyla, k této stimulaci nedošlo. Bylo popsáno, že zánět vyvolaný DSS, stimuluje přímo naivní lymfocyty ke spuštění Th2 diferenciaci, která je charakterizována produkcí cytokinů IL-4, IL-5, ale také IL-10 (Mudter a Neurath, 2007). Náš nález stimulace IL-10 v zánětlivém střevě je tedy ve shodě s citovanou studií.

Laktobacily byly myším podávány krátkodobě, a proto usuzujeme, že nemohly významnou měrou ovlivnit systémovou imunitní odpověď. Stanovili jsme cytokiny TNF- α , IL-6 a IL-10 v supernatantech po kultivaci slezinných lymfocytů nebo buněk mezenteriálních lymfatických uzlin. Nezaznamenali jsme výrazné změny v cytokinových profilech u myší, které dostávaly kromě DSS také *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P, v porovnání s těmi, které laktobacily nedostávaly. Domníváme se, že větší výpovědní hodnotu mají výsledky stanovení lokální imunitní odpovědi, neboť probiotika působí přímo ve střevní sliznici (Hanniffy et al., 2004). Hodnotit hlouběji výsledky získané po kultivaci buněk mezenteriálních lymfatických uzlin nemůžeme, protože uzliny

jednotlivých skupin zvířat byly poolovány, a proto nelze výsledky statisticky vyhodnotit.

Domníváme se, že i když naše studie vlivu bakterie *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P na experimentální střevní zánět u myši prokázala její ochranný účinek, je cesta k tomu, aby byla uznána jako probiotikum, ještě dlouhá. Budeme studovat její vliv jak profylaktický, tak terapeutický v dlouhodobých studiích, kdy bude vyvolán nikoliv akutní, ale chronický zánět, který je lidské ulcerózní kolitidě podobnější.

Probiotika představují velmi perspektivní profylaktickou a terapeutickou koncepci, ale je nutné podrobně studovat mechanismus jejich působení, a tím umožnit rozhodování, které probiotické bakterie budou k léčbě určitých onemocnění nejvhodnější, protože léčba probiotiky je sice relativně bezpečná, ale není zcela bez rizika. Zdá se, že probiotika by mohla za určitých okolností působit i patogenně. Mezi možné nežádoucí účinky probiotické terapie patří riziko bakteriální translokace, což je průchod živých bakterií z GIT do mezenterálních lymfatických uzlin a dalších orgánů. U zdravého jedince je bakteriální translokace značně regulovaná. Pokud je integrita střevní bariéry porušena výrazně nebo pokud imunitní systém není schopen zvládnout infekci, patogenní bakterie se mohou dostat do krevního řečiště a způsobit sepsi (Pavan et al., 2003). V současné době je nedostatek klinických srovnávacích studií (dvojitě zaslepených a kontrolovaných placebem), ve kterých jsou probiotika podávána (Junkers a Stockbrügger, 2003). Studie často nezohledňují optimální frekvenci a způsob podávání probiotik ani možné nežádoucí účinky na vážně nemocné či oslabené pacienty (Chermesh a Eliakim, 2006), stejně jako kritéria výběru bakteriálních kmenů na základě funkčních charakteristik *in vitro* a *in vivo* studií. Dávka a frekvence podávání těchto bakterií závisí na jejich rezistenci k proteolytickým enzymům, nízkému pH a vysoké koncentraci žlučových solí. Až na základě těchto předběžných studií by měl být vybrán bakteriální kmen s nejvýhodnějšími vlastnostmi, který by byl dále podroben zkoumání na zvířecích modelech a potom teprve by mohl být podáván pacientům (Pavan et al., 2003; Daniel et al., 2006).

Využití metod molekulární mikrobiologie, genetiky a imunologie v oblasti probiotik dovoluje předpokládat, že budoucnost tohoto terapeutického směru je

slibná, zejména při znalosti úplného genomu probiotických bakterií. Jako perspektivní budoucí cíle lze uvést řízenou postnatální kolonizaci trávicí trubice s využitím probiotik jako nosičů vakcín a přípravu rekombinantních probiotik s *in situ* tvorbou a cílenou aplikací terapeutických molekul (Hanniffy et al., 2004; Frič, 2005).

6 Závěr

Studovali jsme vliv bakterie *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P na vývoj střevního zánětu podobnému lidské ulcerózní kolitidě, který byl vyvolán podáváním dextransulfátu sodného (DSS) BALB/c myším. Bakterie *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P byla vybrána pro své možné probiotické účinky. Druhé dvě skupiny myší byly kontrolní. Jedna skupina zvířat dostávala místo laktobacilů pouze čisté kultivační médium, ve kterém se laktobacily kultivují – MRSC, druhá pak fosfátový pufr (PBS).

- **Makroskopické klinické příznaky kolitidy** (průjem, krvácení z rekta) jsme zaznamenali u myší, které dostávaly *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P a DSS jen u třetiny zvířat, ve srovnání s myši obou dalších skupin, které dostávaly MRSC médium a DSS nebo PBS a DSS – všechny měly průjem a masivně krvácely z rekta.
- **Ubývání hmotnosti.** Podávání *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P ochránilo myši, ve srovnání s kontrolními skupinami, před úbytkem hmotnosti.
- **Délka tlustého střeva.** Zkrácení tlustého střeva, které je parametrem akutní kolitidy, nebylo u skupiny myší, které dostávaly probiotikum a DSS, pozorováno. Tlusté střevo bylo signifikantně delší oproti kontrolní skupině, která dostávala PBS a DSS ($P < 0,005$).
- **Histologické hodnocení střevní sliznice** ukázalo, že skupina myší (*Lb. paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P + DSS) vykazovala pouze mírné změny v oblasti *colon descendens*. Zjistili jsme normální produkci mucinu pohárkovými buňkami, který chrání střevní epitel před poškozením. Na druhé straně u kontrolních skupin jsme zaznamenali výrazné zánětlivé změny sliznice v *colon descendens*. Došlo k vymizení krypt a výrazné infiltraci zánětlivých buněk do *lamina propria* a submukózy. U vzorků získaných od kontrolních skupin jsme zaznamenali sníženou produkci mucinu, což odpovídalo snížení počtu pohárkových buněk.

- **Hladina prozánětlivého cytokinu TNF- α** v supernatantech po kultivaci tkáně z *colon descendens*, kde se nejvíce projevují zánětlivé změny vyvolané podáváním DSS, byla výrazně nižší u myší, kterým bylo podáváno probiotikum, a to jak u *in vitro* nestimulovaných, tak u vzorku stimulovaných *in vitro* formolizovanými laktobacily, kde bylo toto snížení signifikantní ($P < 0,05$; RL14-P + DSS vs. PBS + DSS).
- **Hladina prozánětlivého cytokinu IL-6** v supernatantech po kultivaci tkáně z *colon descendens* byla výrazně snižená u myší, kterým bylo podáváno probiotikum, v porovnání s kontrolami.
- **Hladina protizánětlivého cytokinu IL-10** v supernatantech po kultivaci tkáně z *colon descendens* byla u myší, které dostávaly *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P, nízká v porovnání s kontrolami. Domníváme se, že během zánětu dochází v první obranné linii k sekreci IL-10, aby se zabránilo poškození tkáně. Buňky nezánnětlivé tkáně tento cytokin nesecernovaly.
- **Systémová odpověď.** Při zkoumání systémové imunitní odpovědi jsme dosáhli nejednoznačných a obtížně interpretovatelných výsledků. Domníváme se, že větší výpovědní hodnotu mají výsledky stanovení lokální imunitní odpovědi, neboť probiotika působí přímo ve střevní sliznici. Laktobacily byly myším podávány krátkodobě, a proto usuzujeme, že nemohly významnou měrou ovlivnit systémovou imunitní odpověď.

Výsledky ukazují, že intragastrická aplikace bakterie *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P myším má protektivní účinek u experimentálního modelu akutní ulcerózní kolitidy. Sekrece prozánětlivých cytokinů z postižené střevní sliznice byla redukována, což naznačuje schopnost *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* RL14-P regulovat hladiny prozánětlivých cytokinů přímo v místě zánětu. Domníváme se, že zmíněná bakterie má určité probiotické účinky, ale je nutné ji ještě dále testovat, a to jak z bezpečnostního hlediska (studium jejího vlivu na citlivá bezmikrobní zvířata), tak i její podávání při chronickém zánětu.

7 Literatura

- ANDOH, A., FUJIYAMA, Y.: Therapeutic approaches targeting intestinal microflora in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.*, 2006, roč. 12, č. 28, s. 4452-4460.
- BAI, A.P., OUYANG, Q., XIAO, X.R., LI, S.F.: Probiotics modulate inflammatory cytokine secretion from inflamed mucosa in active ulcerative colitis. *Int. J. Clin. Pract.*, 2006, roč. 60, č. 3, s. 284-288.
- BOUMA, G., STROBER, W.: The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 2003, roč. 3, s. 521-533.
- BRANDTZAEG, P., KIERULF, P., GAUSTAD, P.: Plasma endotoxin as a predictor of multiple organ failure and death in systemic meningococcal disease. *J. Infect. Dis.*, 1989, roč. 159, s. 195-204.
- BUC, M.: Súčasný pohľad na imunopatogézu Crohnovej choroby. Sborník 21. pracovnej imunologickej konferencie – Imunologie 2004, (Lochman, I., Weigl, E., Bilej, M., Eds.), Praha: Česká imunologická společnost, 2004, s. 11-15.
- CEBRA, J.J.: Influences of microbiota on intestinal immune system development. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1999, roč. 69, s. 1046-1051.
- COOPER, H.S., MURTHY, S.N., SHAH, R.S., SEDERGRAN, D.J.: Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab. Invest.*, 1993, roč. 69, s. 238-249.
- CROWTHER, J.R.: ELISA theory and practice. In: *Methods in molecular biology*, vol. 42, Totowa, New Jersey: Humana Press, 1995, s. 223.
- DANIEL, C., POIRET, S., GOUDERCOURT, D., DENNIN, V., LEYER, G., POT, B.: Selecting lactic acid bacteria for their safety and functionality by use of

- a mouse colitis model. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, roč. 72, č. 9, s. 5799-5805.
- EWASCHUK, J.B., DIELEMAN, L.A.: Probiotics and prebiotics in chronic inflammatory bowel diseases. *World J. Gastroenterol.*, 2006, roč. 12, č. 37, s. 5941-5950.
- FERENČÍK, M., EBRINGER, L.: Probiotiká, alergia a astma. *Alergie*, 2003, roč. 3, s. 224-230.
- FRESHNEY, R.: Culture of animal cells: A manual of basic technique. 2. vyd. New York: Alan R. Liss, Inc., 1987, s. 117.
- FRIČ, P.: Probiotika v terapii chorob trávicího ústrojí. *Interní medicína pro praxi*, 2005, roč. 5, s. 434-437.
- GEIER, M.S., BUTLER, R.N., HOWARTH, G.S.: Inflammatory bowel disease: current insights into pathogenesis and new therapeutic options; probiotics, prebiotics and synbiotics. *Int. J. Food Microbiol.*, 2007, roč. 115, s. 1-11.
- GIONCHETTI, P., RIZZELLO, F., LAMMERS, K.M., MORSELLI, C., SOLLAZZI, L., DAVIES, S., TAMBASCO, R., CALABRESE, C., CAMPIERI, M.: Antibiotics and probiotics in treatment of inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.*, 2006, roč. 12, č. 21, s. 3306-3313.
- GOMES, A.M.P., MALCATA, F.X.: Bifidobacterium spp. and lactobacillus acidophilus: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends Food Sci. Technol.*, 1999, roč. 10, s. 139-157.
- HANNIFFY, S., WIEDERMANN, U., REPA, A., MERCENIER, A., DANIEL, C., FIORAMONTI, J., TLASKALOVÁ, H., KOZÁKOVÁ, H., ISRAELSEN, H., MADSEN, S., VRANG, A., HOLS, P., DELCOUR, J., BRON, P., KLEEREBEZEM, M., WELLS, J.: Potential and opportunities for use of

recombinant lactic acid bacteria in human health. vol. 56, (Laskin, A.I., Bennett, J.W., Gadd, G.M., Eds.), San Diego: Elsevier Academic Press, *Adv. Appl. Microbiol.*, 2004, s. 1-64.

HOŘEJŠÍ, V., BARTUŇKOVÁ, J: Základy imunologie. 2. vyd. Praha: Triton, 2001, s. 260.

HUDCOVIC, T., ŠTĚPÁNKOVÁ, R., CEBRA, J., TLASKALOVÁ - HOGENOVÁ, H.: The role of microflora in the development of intestinal inflammation: acute and chronic colitis induced by dextran sulfate in germ-free and conventionally reared immunocompetent and immunodeficient mice. *Folia Microbiol.*, 2001, roč. 46, č. 6, s. 565-572.

HUDCOVIC, T., ŠTĚPÁNKOVÁ, R., KOZÁKOVÁ, H., HRNČÍŘ, T., TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ, H.: Effects of *Escherichia coli* strains (*E. coli* O6K13 and *E. coli* Nissle 1917) monocolonization on the development of experimentally induced acute and chronic intestinal inflammation in germ-free immunocompetent and immunodeficient mice. *Folia Microbiol.*, 2007, roč. 52, č. 6, s. 618-626.

CHERMESH, I., ELIAKIM, R.: Probiotics and the gastrointestinal tract: where are we in 2005? *World J. Gastroenterol.*, 2006, roč. 12, č. 6, s. 853-857.

JONKERS, D., STOCKBRÜGGER, R.: Probiotics and inflammatory bowel disease. *J. R. Soc. Med.*, 2003, roč. 96, s. 167-171.

KANDLER, O., WEISS, N.: Genus *Lactobacillus*. In: Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 2, (Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G., Eds.), 9. vyd. Baltimore: Williams and Wilkins, 1986, s. 1063-1065.

KANKURI, E., HAMALAINEN, M., HUKKANEN, M., SALMENPERA, P., KIVILAAKSO, E., VAPAATALO, H., MOILANEN, E.: Suppression of pro-inflammatory cytokine release by selective inhibition of inducible nitric

- oxide synthase in mucosal explants from patients with ulcerative colitis. *Scand. J. Gastroenterol.*, 2003, roč. 38, s. 186-192.
- KARLINGER, K.: The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Europ. J. Radiol.*, 2000, roč. 3, s. 154-167.
- KAWADA, M., ARIHIRO, A., MIZOGUCHI, E.: Insights from advanced in research of chemically induced experimental models of human inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.*, 2007, roč. 13, č. 42, s. 5581-5593.
- KLEMER, P., KLEMEROVÁ, V.: Základy aplikované statistiky pro studující farmacie. 3. vyd. Praha: Karolinum, 1999, s. 84.
- KOKEŠOVÁ, A., FROLOVÁ, L., KVERKA, M., SOKOL, D., ROSSMANN, P., BÁRTOVÁ, J., TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ, H.: Oral administration of probiotic bacteria (*E. coli* Nissle, *E. coli* O83, *Lactobacillus casei*) influences the severity of dextran sodium sulfate-induced colitis in BALB/c mice. *Folia Microbiol.*, 2006, roč. 51, č. 5, s. 478-484.
- KOZÁKOVÁ, H., ŘEHÁKOVÁ, Z., KOLÍNSKÁ, J.: *Bifidobacterium bifidum* monoassociation of gnotobiotic mice: effect on enterocyte brush-border enzymes. *Folia Microbiol.*, 2001, roč. 46, s. 573-576.
- LODINOVÁ-ŽÁDNÍKOVÁ, R., SONNENBORN, U., TLASKALOVÁ, H.: Probiotics and *E. coli* infections in man. *Vet. Q.*, 1998, roč. 20, s. 78-81.
- LUKÁŠ, M.: Zvláštnosti diagnostiky a terapie idiopatických střevních zánětů ve vyšším věku. *Čes. Ger. Rev.*, 2007, roč. 5, č. 2, s. 68-71.
- MACH, T.: Clinical usefulness of probiotics in inflammatory bowel disease. *J. Physiol. Pharmacol.*, 2006, roč. 57, č. 9, s. 23-33.

- MADSEN, K.L.: The use of probiotics in gastrointestinal disease. *Can. J. Gastroenterol.*, 2001, roč. 15, s. 817-822.
- MATSUMOTO, S., HARA, T., HORI, T., MITSUYAMA, K., NAGAOKA, M., TOMIYASU, N., SUZUKI, A., SATA, M.: Probiotic lactobacillus-induced improvement in murine chronic inflammatory bowel disease is associated with the down-regulation of pro-inflammatory cytokines in lamina propria mononuclear cells. *Clin. Exp. Immunol.*, 2005, roč. 140, s. 417-426.
- MATULKA, M.: Imunopatologie chronických střevních zánětů. *Alergie*, 2001, roč. 3, č. 3. <http://www.tigis.cz/alergie/Index.htm>
- MAXA, V., RADA, V.: Význam probiotik a prebiotik pro výživu a zdraví. *Potravinářské aktuality – Mlékárenský průmysl*, 2000, roč. 43, č. 1, s. 28-34.
- McGEADY, S.J.: Immunocompetence and allergy. *Pediatrics*, 2004, roč. 113, č. 4, s. 1107-1113.
- METCHNIKOFF, E.: The prolongation of life. Optimistic studies. (Mitchell, C., Ed.), London: William Heinemann, 1907, s. 161-183. Převzato z Gionchetti et al., 2006.
- MICHALÍK, I., URMINSKÁ, D., BAUEROVÁ, M., ŠILHÁR, S., SOKOL, J., OUWEHAND, A., KIRJAVAINEN, P., SHORTT, C., SALMINEN, S.: Probiotics: mechanism and established effects. *Intl. Dairy J.*, 1999, roč. 9, s. 43-42.
- MUDTER, J., NEURATH, M.F.: IL-6 signaling in inflammatory bowel disease: pathophysiological role and clinical relevance. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2007, roč. 13, č. 8, s. 1016-1023.
- NEVORAL, J.: Prebiotika, probiotika a synbiotika. *Pediatric pro praxi*, 2005, roč. 2, s. 59-65.

- OKAYASU, I., HATAKEYAMA, S., YAMADA, M., OHKUSA, T., INAGAKI, Y., NAKAYA, R.: A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*, 1990, roč. 98, s. 694-702.
- OSMAN, N., ADAWI, D., AHRNE, S., JEPSSON, B., MOLIN, G.: Modulation of the effect of dextran sulfate sodium-induced acute colitis by the administration of different probiotic strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *Dig. Dis. Sci.*, 2004, roč. 49, č. 2, s. 320-327.
- OSMAN, N., ADAWI, D., MOLIN, G., AHRNE, S., BERGGREN, A., JEPSSON, B.: *Bifidobacterium infantis* strains with and without a combination of oligofructose and inulin attenuate inflammation in DSS-induced colitis in rats. *BMC Gastroenterology*, 2006, roč. 6, č. 31. <http://www.biomedcentral.com/1471-230X/6/31>
- PAVAN, S., DESREUMAUX, P., MERCENIER, A.: Use of mouse models to evaluate the persistence, safety and immune modulation capacities of lactic acid bacteria. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2003, roč. 10, č. 4, s. 696-701.
- PERAN, L., CAMUESCO, D., COMALADA, M., NIETO, A., CONCHA, A., DIAZ-ROPERO, M.P., OLIVARES, M., XAUS, J., ZARZUELO, A., GALVEZ, J.: Preventative effects of a probiotic *Lactobacillus salivarius* ssp. *salivarius* in the TNBS model of rat colitis, *World J. Gastroenterol.*, 2005, roč. 11, s. 5185-5192.
- POWRIE, F.: T cells in inflammatory bowel disease: Protective and pathogenic roles. *Immunity*, 1995, roč. 3, s. 171-174.
- RUTGEERTS, P., FEAGAN, B.G., LICHTENSTEIN, G.R., MAYER, L.F., SCHREIBER, S., COLOMBEL, J.F., RACHMILEWITZ, D., WOLF, D.C., OLSON, A., BAO, W., HANAUER, S.B.: Comparison of scheduled and

- episodic treatment strategies of infliximab in Crohn's disease. *Gastroenterology*, 2004, roč. 126, s. 402-413.
- SANDERS, M.E.: Probiotics. *Food Technol.*, 1999, roč. 53, č. 11, s. 67-77.
- SCHULTZ, M., STRAUCH, U.G., LINDE, H.J., WATZL, S., OBERMEIER, F., GÖTTL, C., DUNGER, N., GRUNWALD, N., SCHÖLMERICH, J., RATH, H.C.: Preventive effects of Escherichia coli strain Nissle 1917 on acute and chronic intestinal inflammation in two different murine models of colitis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2004, roč. 11, č. 2, s. 372-378.
- SPIEGEL, J.E.: Safety and benefits of fructooligosacharides as food ingredients. *Food Technol.*, 1994, roč. 48, s. 85-89.
- STEIDLER, L., HANS, W., SCHOTTE, L., NEIRYNCK, S., OBERMEIER, F., FALK, W., FIERS, W., REMAUT, E.: Treatment of murine colitis by Lactococcus lactis secreting interleukin-10. *Science*, 2000, roč. 289, s. 1352-1355.
- STROBER, W., EHRHARDT, R.O.: Chronic intestinal inflammation: an unexpected outcome in cytokine or T cell receptor mutant mice. *Cell*, 1993, roč. 78, s. 203-205.
- ŠILHÁNKOVÁ, L.: Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. 3. vyd. Praha: Academia, 2002, s. 363.
- ŠROUBKOVÁ, R., HRUBANT, K.: Indikace k chirurgické léčbě u idiopatických zánětů střevních. *Časopis lékařů českých*, 2003, roč. 142, č. 6, s. 351-355.
- ŠTĚPÁNKOVÁ, R.: Rearing of germ-free rats, mice, and rabbits. In: Immunology Methods Manual, (Lefkovits, I., Ed.), Gnotobiological Models, (Tlaskalová, H., Šterzl, J., Eds.), New York: Academic Press, 1997, s. 1537-1542.

ŠTĚPÁNKOVÁ, R., POWRIE, F., KOFRONOVÁ, O., KOZÁKOVÁ, H., HUDCOVIC, T., HRNČÍŘ, T., UHLIG, H., READ, S., ŘEHÁKOVÁ, Z., BENADA, O., HECZKO, P., STRUS, M., BLAND, P., TLASKALOVÁ – HOGENOVÁ, H.: Segmented filamentous bacteria in defined bacterial cocktail induce intestinal inflammation in SCID mice reconstituted with CD45RB^{high} CD4⁺ T cells. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2007, roč. 13, č. 10, s. 1202-1211.

WIRTZ, S., NEURATH, M.F.: Mouse models of inflammatory bowel disease. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2007, roč. 59, s. 1073-1083.

ZHANG, S., ZHAO, X., ZHANG, D.: Cellular and molecular immunopathogenesis of ulcerative colitis. *Cell. Mol. Immunol.*, 2006, roč. 3, č. 1, s. 35-40.

7.1 Zdroje obrázků

<http://www.bact.wisc.edu/themicrobialworld/Normalflora.html>, Todar, K.: The normal flora of humans, 3. 12. 2007.

<http://www3.niaid.nih.gov>, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, 3. 11. 2007.

<http://www.endowsec.com/pated/eicncluc.htm>, West Shore Endoscopy Center, 22. 2. 2008.

<http://www.endowsec.com/pated/eicnclcd.htm>, West Shore Endoscopy Center, 22. 2. 2008.