

**Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**



**Studium adhezivity laktobacilů na různé buněčné linie**  
**v modelu *in vitro***

Diplomová práce

**Bc. Blanka Florová**

Školitel: Ing. Vítězslav Březina, CSc.

Školitel-specialista: PharmDr. Hana Kiňová Sepová, PhD.

České Budějovice 2012

**Florová B., 2012:** Studium adhezivity laktobacilů na různé buněčné linie v modelu *in vitro* [Study of the adhesivity of lactobacilli to various cell lines on *in vitro* model]. Mgr. Thesis, in Czech – 65p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Annotation:**

The aim of this work was to evaluate binding and interaction between eukaryotic (Caco-2, HeLa and L929 cells) and prokaryotic (*Lactobacillus mucosae* D) cells and determined the degree of adhesivity of prokaryotic to eukaryotic cells. For the purpose of determining the main structures responsible for prokaryotic-eukaryotic cell binding the surface of lactobacilli was digested by trypsin, pronase E and proteinase K. The degree of adhesivity was evaluated by optical microscopy and the significant influence of used proteases was observed. It seems that protein structures play the significant role in potential probiotic cell binding. The other aim of study was to observe interaction between *L. mucosae* D and *Staphylococcus aureus* CCM 4516 in binding on surface of Caco-2 cells. Overall, *S. aureus* adhered on surface of Caco-2 cells better than the *L. mucosae* DS. *aureus* has the highest ability to adhere on Caco-2 cells in the competition assay (57,29 %) and the lowest in the exclusion assay (38,70 %). The highest ability to adhere on Caco-2 cells of *L. mucosae* D was in exclusion assay (18,60 %), the lowest in the displacement test (10,90 %). The morphological differences between Caco-2 cells co-cultivated with bacterial strain and Caco-2 cells cultivated alone were observed.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatněpouze s použitím pramenů literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podoběelektronickou cestou, ve veřejněpřístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentůpráce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce.

Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne .....

.....

Blanka Florová

## Poděkování

Velice bych chtěla poděkovat svému školiteli Ing. Vítězslavu Březinovi, CSc. za odborné rady, pomoc při provádění pokusů a celkově za zkušené vedení. Mé další díky patří PharmDr. Haně Kiňové Sepové zejména za trpělivost a rady v různých otázkách. Děkuji také všem pracovníkům v Centru biologických technologií v Nových Hradech, kteří mi byli nápomocni, zejména Monice Homolkové, Pavlíně Tláskalové a Šárce Beranové.

Práce byla řešena v návaznosti na grant MŠMT Gastprobio "Identifikace a charakterizace nových kmenů bakterií s probiotickými vlastnostmi určených pro prevenci civilizačních onemocnění", č. 2B 08068.

# Obsah

1	Úvod .....	1
1.1	Probiotické mikroorganismy .....	1
1.2	<i>Lactobacillus spp.</i> .....	5
1.2.1	<i>Lactobacillus mucosae</i> .....	6
1.3	Adhezivita .....	6
1.4	Eukaryotní buňky .....	12
1.4.1	HeLa buňky .....	12
1.4.2	Caco-2 buňky .....	13
1.4.3	L929 buňky .....	13
1.5	Cíle práce .....	14
2	Materiál a metodika .....	16
2.1	Kultivační média, chemikálie a přístrojová technika .....	16
2.1.1	Média .....	16
2.1.2	Chemikálie a složení roztoků .....	19
2.1.3	Přístroje .....	20
2.2	Použité mikroorganismy a buněčné linie .....	20
2.2.1	Bakteriální kultury .....	20
2.2.2	Tkáňové kultury a jejich původ .....	21
2.3	Opracování <i>Lactobacillus mucosae</i> D proteolytickými enzymy .....	22
2.4	Koinkubace Caco-2 buněk s <i>Lactobacillus mucosae</i> D a <i>Staphylococcus aureus</i> ...	22
2.5	Příprava preparátů pro optickou mikroskopii .....	23
2.5.1	Úvod .....	23
2.5.2	Fixace, barvení, odvodňování .....	23
2.6	Vyhodnocování preparátů .....	24
2.7	Mikrokinematografické zobrazení vazby mezi prokaryotní a eukaryotní buňkou ..	24
2.8	Skenovací elektronová mikroskopie .....	24
2.8.1	Úvod .....	24
2.8.2	Koinkubace Caco-2 buněk s <i>L. mucosae</i> D a <i>S. aureus</i> .....	25
3	Výsledky .....	26
3.1	Vliv <i>Lactobacillus mucosae</i> D na adhezenci <i>Staphylococcus aureus</i> na povrch eukaryotní buňky .....	26
3.2	Úloha povrchových proteinů laktobacilů v adhezenci na povrch eukaryotních buněk .....	29
3.2.1	Úvod .....	29
3.2.2	Míra adhezivity <i>L. mucosae</i> D na povrch HeLa buněk .....	30
3.2.3	Míra adhezivity <i>L. mucosae</i> D na povrch Caco-2 buněk .....	33
3.2.4	Míra adhezivity <i>L. mucosae</i> D na povrch L929 buněk .....	35

3.2.5	Míra adhezivity <i>L. mucosae</i> D na povrch HeLa, Caco-2 a L929 buněk – porovnání jednotlivých tkáňových kultur.....	37
3.3	Mikrokinematografické zobrazení vazby mezi prokaryotní a eukaryotní buňkou ..	40
3.4	Studium vztahu eukaryotních a prokaryotních buněk a jejich vzájemné vazby a morfolgie.....	42
4	Diskuze .....	45
5	Závěry.....	50
6	Literatura .....	52
7	Seznam zkratk a symbolů .....	65

# 1 Úvod

## 1.1 Probiotické mikroorganismy

Organizace pro výživu a zemědělství („Food and Agriculture Organization of the United Nations”, FAO) a Světová zdravotnická organizace („World Health Organization“, WHO) (2001) charakterizuje probiotika jako „živé mikroorganismy, které pokud jsou přijímané v adekvátním množství, mají pozitivní vliv na hostitele.“

Jako probiotika jsou používány kmeny různých rodů (viz. Tab. I). Nejběžněji používané mikroorganismy patří do heterogenní skupiny bakterií mléčného kvašení; jsou to hlavně laktobacily, enterokoky a bifidobakterie. Zejména laktobacily jsou obecně používány jako probiotika, což může mít historické důvody – Mečnikov totiž navrhl, že laktobacily v jogurtu by mohly zlepšovat zdraví. Zřejmě proto je dodnes nejobvyklejším způsobem podávání probiotik ve formě fermentovaných mléčných výrobků. Nicméně i jiné mikroorganismy, dokonce i kvasinky, byly v průběhu posledních dvaceti let použity jako potenciální probiotika (viz. Tab. I). Přípravky obsahující tyto kmeny jsou dostupné v lékárnách, např. Swiss LAKTOBACILY 5 cps. 60 enterický povlak (Swiss Herbal Remedies Ltd., Kanada) obsahuje laktobacily a bifidobakterie, GS Laktobacily Forte s prebiotiky cps. 60 (Green-Swan Pharmaceuticals ČR, a.s, Praha) obsahuje laktobacily, bifidobakterie a streptokoky, ActiLac Tob. 30 (SVUS Pharma a.s., Hradec Králové), Akut Biotic tob. 30 (Valosun a.s., Brno) obsahuje kromě laktobacilů probiotické kvasinky *Saccharomyces boulardii* a prebiotické vlákniny (fruktooligosacharidy, inulin).

**Tab. I:** Mikroorganismy využívané jako probiotika a jejich pozitivní účinky na lidské zdraví prokázané během klinického výzkumu.

<b>ROD</b>	<b>DRUH</b>	<b>KMEN</b>	<b>POZITIVNÍ ÚČINKY NA ZDRAVÍ</b>	<b>LITERATURA</b>
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	La5	Snižuje riziko vzniku postantibiotických průjmů.	Black a kol., 1991
	<i>casei</i>	Shirota	Snižuje riziko recidivy	Aso a kol., 1995

			<p>karcinomu močového měchýře.</p> <p>Modulace imunitního systému.</p> <p>Zkracuje trvání průjmů způsobených rotaviry.</p>	<p>Nagao a kol., 2000</p> <p>Sugita &amp; Togawa, 1994</p>
	<i>johnsonii</i>	La1	<p>Snižuje riziko kolonizace <i>Helicobacter pylori</i>.</p> <p>Zlepšuje účinek orální vakcinace.</p>	<p>Felley a kol., 2001</p> <p>Link–Amster a kol., 1994</p>
	<i>plantarum</i>	299v	<p>Snižuje hladinu LDL–cholesterol v krvi.</p> <p>Zmírnění projevů syndromu dráždivého střeva.</p>	<p>Bukowska a kol., 1998</p> <p>Niedzielin a kol., 2001</p>
	<i>reuteri</i>	SD2112	<p>Zkracuje trvání průjmů způsobených rotaviry</p>	<p>Shornikova a kol., 1997</p>
	<i>rhamnosus</i>	GG	<p>Zkracuje trvání průjmů způsobených rotaviry.</p>	<p>Guandalini a kol., 2000</p>

			Zmírnění střevního zánětu.  Modulace imunitního systému.  Léčba a prevence alergie.	Gupta a kol., 2000  Kaila a kol., 1992  Kalliomäki a kol., 2001b; Majamaa & Isolauri, 1997
	<i>salivarius</i>	UCC118	Zmírňuje symptomy střevního zánětu.	Mattila–Sandholm a kol., 1999
<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>		Zmírnění projevů syndromu dráždivého střeva.	Brigidi a kol., 2001
	<i>lactis</i>	Bb12	Snižuje riziko výskytu cestovatelského průjmu.  Léčba alergie.  Zlepšuje účinky orální vakcinace.  Zkrácení trvání průjmů způsobených rotaviry.	Black a kol., 1989  Isolauri a kol., 2001  Link–Amster a kol., 1994  Saavedra a kol., 1994



<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	Nissle 1917	Méně recidiv střevního zánětu.	Malchow 1997
<i>Saccharomyces</i>	<i>boulardii</i>		Méně recidiv střevního zánětu.	Guslandi a kol., 2000

Účinky a jejich mechanismus působení se mohou lišit. Mezi nejzřetelnější účinky patří změny střevní mikroflóry po požití probiotik. Tento jev může být, podle Fullera (1991), způsoben soupeřením o místo pro adhezi mezi přijatými mikroorganismy a potenciálními patogeny, nebo také soupeřením o živiny. Dalším, odlišným způsobem účinku je produkce antimikrobiálních látek. Mikroorganismy se také mohou přizpůsobit mikrobiálnímu metabolismu ve střevech, což lze zjistit např. změnou enzymatické aktivity, změnou pH nebo změnou hladiny cholesterolu (Orrhage a kol., 2005).

Výběr mikroorganismů použitých jako probiotika je určen několika faktory (viz. Tab. II). Například musí být schopné přežít průchod gastrointestinálním traktem (GIT), rezistentní k nízkému pH, žluči a pankreatickým enzymům.

**Tab. II:** Hlavní vlastnosti probiotických bakterií (podle Ouwehanda a kol., 2002).

<b>VLASTNOSTI</b>	<b>PROSPĚCH</b>
Rezistence k žaludeční kyselině, pankreatickým enzymům a žluči.	Přežit průchod GIT.
Adhezivita ke střevní sliznici.	Imunitní modulace. Vytěsnění patogenů. Urychlení hojení poškozené sliznice.
Lidský původ.	Kmeny se specifickou interakcí s hostitelem.
Prokázané pozitivní účinky na zdraví.	Navrhované pozitivní účinky na zdraví jsou prokázané.
Bezpečnost.	Žádné riziko pro konzumenta.
Dobré technologické vlastnosti.	Stabilita kmenu. Produkce ve vysokém měřítku. Kyslíková tolerance.

Jak už bylo zmíněno, probiotické účinky jednotlivých kmenů se liší. Na základě toho musí být podle FAO/WHO (2001) provedena kmenová identifikace (genová typizace), např. metodou gelové elektroforézyv pulzním elektrickém poli („Pulsed Field Gel Electrophoresis“, PFGE). Jako první se doporučuje udělat nejprve fenotypové testy a poté genovou identifikaci, např. použitím metody DNA/DNA hybridizace, sekvenování 16S rDNA nebo jiné, mezinárodně uznávané metody. Pro potvrzení správné identifikace se používá RDP – „Ribosomal Database Project“ ([www.cme.msu.edu/RDP/](http://www.cme.msu.edu/RDP/)) nebo GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)).

## 1.2 *Lactobacillus spp.*

Rod *Lactobacillus* patří k nejpočetnější skupině mezi bakteriemi mléčného kvašení. Jsou to nesporulující, gram pozitivní (G+) tyčky, které jsou součástí fyziologické bakteriální mikroflóry, jež se obvykle nachází v ústní dutině, gastrointestinálním traktu a v ženském urogenitálním traktu (Cannon a kol., 2005, Kononen & Wade, 2007, Madigan a kol., 2006). Většina druhů laktobacilů je fakultativně anaerobní, rostou v přítomnosti i nepřítomnosti anaerobního prostředí. Pouze asi 20% druhů izolovaných od lidí jsou obligátní anaerobové. Laktobacily dobře rostou na krevním agaru (Summanen a kol., 1993). Některé z nich rostou také na selektivním médiu pro laktobacily. Kyselina mléčná je hlavním, a zároveň konečným metabolickým produktem laktobacilů při fermentaci glukózy (Kononen & Wade, 2007, Madigan a kol., 2006). Kyselina octová a kyselina jantarová jsou produkovány u heterofermentativních druhů, ovšem pouze v malých množstvích. Některé druhy a kmeny jsou široce používány jako startovací kultury řídící fermentaci potravin a krmiv, a to hlavně mléčných výrobků (sýry, jogurty), fermentovaného masa (klobásy, salámy), fermentované zeleniny (olivy, okurky) nebo kynutého pečiva.

GIT různých savců je běžně osídlen rodem *Lactobacillus* (Kononen & Wade, 2007, Madigan a kol., 2006). Mezi nejběžnější druhy laktobacilů izolované z GIT patří *Lactobacillus brevis*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. fermentum* a *L. salivarius*. Laktobacily mohou být izolovány také ze zubního plaku, slin a vaginální oblasti člověka a ostatních savců (Slover a kol., 2008).

V žaludku se vyskytuje  $10^3$ - $10^4$  CFU<sup>1</sup>/g laktobacilů společně se streptokoky a bifidobakteriemi. Důsledkem kyselého prostředí v žaludku je množení většiny mikroorganismů zpomalené. Toto prostředí jsou schopné přežít zejména bakterie mléčného

---

<sup>1</sup> CFU (colony forming unit – jednotka tvořící kolonii) – množství životaschopných buněk, ve kterých kolonie představuje soubor buněk získaných z jedné progenitorové buňky.

kvašení. Pohyby tenkého střeva zabraňují přemnožení mikroorganismů, nicméně v distální části střeva počet bakterií výrazně roste. Počet laktobacilů se v této části zvyšuje až na  $10^3$ - $10^7$  CFU/g.

### 1.2.1 *Lactobacillus mucosae*

Buňky *L. mucosae* jsou G<sup>+</sup>, kataláza negativní tyčky, které se vyskytují jednotlivě, ve dvojicích, nebo tvoří krátké řetězce. Jsou obligátně heterofermentativní a produkují kyselinu mléčnou. Všechny kmeny tohoto druhu, které byly dosud popsány, mají schopnost vázat se na hlen v modelech *in vitro* (Roos a kol., 2000).

Bylo prokázáno, že *L. mucosae* nalezený v savčím GIT má schopnost adherovat na povrch sliznic. Je také schopen adherovat velice pevně k epitelu lidského střeva a produkovat antimikrobiální látky a biofilm, pokud je vystaven fyziologickým podmínkám střeva. Lee a kol. izolovali *L. mucosae* LM1 ze vzorků stolice zdravých selat a jejich předběžné studie, týkající se adhezivity a antibakteriální činnosti, prokázaly dobrou vazebnou aktivitu na hlen v podmínkách *in vitro* a antibakteriální aktivitu vůči patogenním bakteriím (Lee a kol., 2012).

## 1.3 Adhezivita

Interakce probiotik s eukaryotními buňkami odkrývá, mimo jiné, i podstatu funkce probiotik, které mají významnou úlohu pro zdraví. Mikrobiální buňky s probiotickými vlastnostmi jsou v nosiči dopraveny potravou do GIT, kde svou účastí podporují celou řadu reakcí pozitivně ovlivňujících zdravotní stav. Výběr účinného a technologicky odolného mikroorganismu (např. z rodu *Lactobacillus*) je významným krokem ve vývoji probiotického produktu. Při tomto výběru hraje podstatnou roli schopnost prokaryotní buňky adherovat na buňku eukaryotní, neboť pouze interakce mezi těmito buňkami vede k účinnějšímu konečnému efektu.

Adhezivita probiotik na střevní sliznici a epitelové buňky byla dlouho považována za jedno z nejdůležitějších kritérií výběru probiotických mikroorganismů, jelikož tím může prodloužit přežívání probiotických buněk v organismu. Z toho důvodu umožňuje adhezivita probiotik dočasnou kolonizaci střeva, modulaci imunitního systému a konkurenční vytěsňování patogenů (Bezkorovainy, 2001). Ačkoli je důkazů o přilnavosti probiotik na sliznici *in vivo* dosud málo, některé studie ukazují, že tato přilnavost skutečně může nastat a může tedy

sloužit jako jeden z mechanismů působení probiotických mikroorganismů (Blum a kol., 1999).

Na adhezivě laktobacilů na povrch buněk se podílí různé povrchové komponenty. Stejně jako u jiných prokaryot, nejvýznamnější a nejpočetnější adhezivní molekuly představují povrchové proteiny laktobacilů. Významná role proteinových povrchových molekul byla zmíněna v několika studiích (Greene & Klaenhammer, 1994; Tuomola a kol., 2000), které popisují adhezi laktobacilů k hleny a epitelialním buňkám. Bylo identifikováno několik povrchových proteinů laktobacilů a je zřejmé, že laktobacily používají různé způsoby k tomu, aby rozpoznaly povrchové proteiny různých hostitelů, které v těchto procesech fungují. Zahrnují jednak proteiny povrchové vrstvy (tzv. „S-layer“), dále funkčně odlišnou skupinu proteinů s motivem LPXTG v primární sekvenci. Patří sem také nezakotvené housekeeping proteiny, které jsou považovány za cytoplasmatické, jsou vylučovány laktobacily a o způsobu jejich sekrece a mechanismu, který využívají k uchycení na povrch buňky, není příliš známo. Mezi další povrchové struktury patří i transportní proteiny a nakonec také proteiny, které nepatří do žádné ze zmiňovaných proteinových skupin (Antikainen a kol., 2009) (viz. Tab. III).

**Tab. III:** Navržené nebo identifikované adhesivní povrchové proteiny laktobacilů.

<b>ADHEZNÍ MOLEKULA</b>	<b>CÍL</b>	<b>KMEN</b>	<b>LITERATURA</b>
<i>Proteiny povrchových struktur</i>			
S-layer protein	Ptačí střevní epitelialní buňky.	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Schneitz a kol., 1993
CbsA	Kolagen, laminin, kuřecí střevní subepitelialní tkáň.	<i>Lactobacillus crispatus</i> JCM 5810	Toba a kol., 1995
SlpA	Fibronektin, lidská epitelialní buněčná linie.	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC8287	Hynönen a kol., 2002
S-layer protein	Červené krvinky.	<i>Lactobacillus kefir</i> CIDCA 8321, <i>Lactobacillus</i>	Garrote a kol., 2004

		<i>parakefiri</i> CIDCA 8328	
SlpA	Myší ileální epiteliální buňky.	<i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i> M92	Frece a kol., 2005
<i>LPXTG-motiv</i> <i>proteiny</i>			
Mub	Slepičí střevní sliznice, prasečí mucin.	<i>Lactobacillus reuteri</i> 1063	Roos & Jonsson, 2002
Mub (LBA 1392)	Lidská střevní epiteliální buněčná linie.	<i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i> NCFM	Buck a kol., 2005
Lsp	Myší střevní epitel.	<i>Lactobacillus reuteri</i> 100-23	Walter a kol., 2005
Msa (LP 1229)	Manosidy.	<i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i> WCFS1	Pretzer a kol., 2005
LspA	Lidská střevní epiteliální buněčná linie.	<i>Lactobacillus</i> <i>salivarius</i> UCC118	Van Pijkeren a kol., 2006
<i>Cytoplasmatické</i> <i>proteiny</i>			
EF-Tu	Lidská střevní epiteliální buněčná linie, mucin.	<i>Lactobacillus</i> <i>johnsonii</i> NCC533	Granato a kol., 2004
GroEL	Lidská střevní epiteliální buněčná linie, mucin.	<i>Lactobacillus</i> <i>johnsonii</i> NCC533	Bergonzelli a kol., 2006
Enoláza	Laminin, fibronektin, plasminogen.	<i>Lactobacillus</i> <i>crispatus</i> ST1	Antikainen a kol., 2007b; Hurmalainen a kol., 2007
GAPDH	Plasminogen.	<i>Lactobacillus</i> <i>crispatus</i> ST1	Hurmalainen a kol., 2007

<i>Transportní proteiny</i>			
CnBP	Kolagen typu I.	<i>Lactobacillus reuteri</i> NCBI 11951	Roos a kol., 1996
MapA	Prasečí střevní sliznice, lidská střevní epitelální buněčná linie.	<i>Lactobacillus reuteri</i> 104R	Miyoshi a kol., 2006; Rojas a kol., 2002
<i>Ostatní proteiny</i>			
FbpA	Lidská střevní epitelální buněčná linie.	<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM	Buck a kol., 2005

Adhezivní vlastnosti probiotik jsou druhově specifické a existuje několik faktorů ovlivňujících adhezivitu (viz. Tab. IV).

**Tab. IV:** Faktory ovlivňující adhezivní vlastnosti probiotických mikroorganismů.

<b>FAKTOR</b>	<b>STUDIE</b>	<b>VÝSLEDKY</b>	<b>LITERATURA</b>
Nízké pH	Adheze probiotik na Caco-2 epitelové buňky.	Zvýšená adheze.  Změny v adhezi kmenově závislé.	Blum a kol., 1999; Greene a kol., 1994  Riedel a kol., 2006
Přítomnost žluči	Adheze probiotik na sliznici.	Snížená adheze.	Gueimonde a kol., 2005; Ouwehand a kol., 2001
Růstová fáze	Adheze probiotik na Caco-2 epitelové buňky.  Adheze kmene <i>L. fermentum</i> na	Snížená přilnavost v průběhu logaritmické fáze, zvýšená v průběhu stacionární fáze.  Adheze vyšší během stacionární fáze	Blum a kol., 1999  Savage, 1992

FAKTOR	STUDIE	VÝSLEDKY	LITERATURA
	keratinizující žaludeční epitel myši.	v porovnání s exponenciální fází růstu.	
Růstové médium	Adheze potenciálně probiotických kmenů na glykoproteiny získané ileostomií.	Kultivační médium ovlivňuje adhezi.	Ouwehand a kol., 2001
Získaná rezistence na kyselé prostředí	Adheze bifidobakterií rezistentních na působení kyselého prostředí na sliznici.	Může v některých případech zvýšit adhezi.	Collado a kol., 2006
Získaná rezistence na žluč	Adheze bifidobakterií rezistentních na působení žluče na sliznici.	Může zvýšit adhezi.	Gueimonde a kol., 2005
Endogenní mikroflóra	Adheze na sliznici v přítomnosti fekální nebo slizniční mikroflóry.	Endogenní mikroflóra neovlivňuje adhezi na sliznici <i>in vitro</i> .	Ouwehand a kol., 2004; Ouwehand a kol., 1999
Přítomnost jiných probiotických kmenů	Adheze probiotik na prasečí střevní epitelové buňky IPEC-J2.  Adheze kombinace probiotických kmenů na glykoproteiny získané ileostomií.	Probiotika mohou snižovat adhezi jiných kmenů soutěžením o určitá adhezivní místa.  Kombinace probiotik může mít synergický vliv na adhezi.	Larsen a kol., 2007  Ouwehand a kol., 2000
Enzymy trávicího systému	Adheze probiotik na sliznici.	Většinou snížená adheze.	Ouwehand a kol., 2001

FAKTOR	STUDIE	VÝSLEDKY	LITERATURA
	Adheze kmene <i>Propionibacterium acidipropionici</i> na střevní buňky.	Žádný vliv na adhezi.	Zarate a kol., 2002
Vazba mykotoxinů	Adheze kmene <i>L. rhamnosus</i> GG na Caco-2 epitelové buňky.	Snížená adheze, pokud je buňka vázána na mykotoxin.	Kankaanpää a kol., 2000
Přítomnost lignanů	Adheze komerčních probiotik na sliznici.	U některých kmenů zvýšená adheze.	Lahtinen a kol., 2002
Přítomnost Ca <sup>2+</sup> iontů	Adheze probiotických a lidských izolátů na Caco-2 epitelové buňky.  Adheze probiotik na prasečí střevní epitelové buňky IPEC-J2.	Adheze na Ca <sup>2+</sup> v některých případech nezávislá, v jiných na Ca <sup>2+</sup> závislá.  Adheze většiny kmenů s přítomností vápníku vzrostla.	Bernet a kol., 1993; Bernet a kol., 1994; Chauviere a kol., 1992; Coconnier a kol., 1992  Larsen a kol., 2007
Přítomnost Mg <sup>2+</sup> a Zn <sup>2+</sup> iontů	Adheze probiotik na prasečí střevní epitelové buňky IPEC-J2.	Adheze nebyla přítomností Mg <sup>2+</sup> a Zn <sup>2+</sup> iontů ovlivněna.	Larsen a kol., 2007

Adheze k savcím epiteliálním buňkám je pro bakterie klíčový proces k přežití. Pro patogenní bakterie je tato adheze kritickým bodem, protože umožňuje uvolnění enzymů a toxinů, které vyvolávají nekrotický proces přímo v cílové buňce, čímž usnadňují invazi (Jankowska a kol., 2008).

Epiteliální buňky GIT jsou před patogenními bakteriemi chráněny mnoha různými mechanismy. Jedním z nich je snížení infekcí prostřednictvím soutěžení fyziologické a probiotické mikroflóry o vazebná místa s mikrobiálním patogenem a produkce látek s antimikrobiální aktivitou (Baccigalupi a kol., 2005; Ouwehand & Vesterlund, 2003). Aby došlo k infekci, patogenní bakterie musí po průniku střevním hlenemadherovat



na enterocyty (Sylvester a kol., 1996). První krok adheze je u rodu *Salmonella* prostředkován bakteriálními fimbriemi, které rozeznávají určité receptory na eukaryotní buňce (Lehto & Salminen, 1997). Několik studií naznačuje, že bakterie mléčného kvašení mohou zabránit vazbě patogenů, tím snížit kolonizaci střeva a zabránit infekci (Coconnier & Salminen, 1997; Coconnier a kol., 2000; Servin, 2004; Zárate & Nader-Macias, 2006).

Studování bakteriální adheze *in vivo* je obecně obtížné, proto se k těmto experimentům využívají *in vitro* modely se střevními buněčnými liniemi, např. Int-407 (Kapczynski a kol., 2000) nebo Caco-2 (Coconnier a kol., 2000; Lehto & Salminen, 1997). Jsou používány pro studium adhezivitu probiotických bakterií mléčného kvašení a konkurenčního vyloučení patogenních bakterií.

Bakteriální adhezivita ke střevnímu epitelu byla studována v různých *in vitro* modelech zahrnujících polymerní povrchy (Stickler a kol., 2006), střevní sliznici (Ma a kol., 2006) nebo lidskou střevní adenokarcinomovou epitelální monovrstvu Caco-2 buněk (Fogh a kol., 1977). Caco-2 buňky se diferencují podobně jako normální střevní epitelové buňky, vykazující charakteristiku pro nezralý, stejně jako pro zralý enterocyt s funkční hraniční vrstvou mikrokloků a apikálními hydrolázami (Greene & Klaenhammer, 1994). Některé studie popisují adhezivitu různých bakterií mléčného kvašení ke kultivovaným buňkám, *Salmonella* a jiné bakterie, jako soutěž mezi bakteriálními kmeny (Jankowska a kol., 2008). Chauvière a kol. zjistili, že teplem inaktivované laktobacily inhibují adhezi enterotoxigenní *Escherichia coli* (Chauvière a kol., 1992). Podle Mc-Groartyho & Reida (1988) působí laktobacily na patogeny různými mechanismy, např. produkcí antimikrobiálních sloučenin, jako je kyselina mléčná, peroxid vodíku nebo bakteriociny.

## **1.4 Eukaryotní buňky**

### **1.4.1 HeLa buňky**

HeLa buňky jsou rychle rostoucí buňky lidského původu izolované v padesátých letech dvacátého století z neoplazie.

Roku 1951 dostal George Gey malý vzorek lidského nádoru z nemocnice Johna Hopkinse v Baltimoru, Maryland, ze kterého se mu podařilo vytvořit první *in vitro* buněčnou linii, která se používá dodnes. Vzorek rakoviny pocházel z děložního čípku mladé ženy přezdívané Henrietta Lacks. Rakovina děložního čípku se zpravidla rozvíjí velice pomalu a průměrná doba přežití je nejméně pět let. V tomto případě byl ovšem nádor neobvyklý – byl měkký, fialový a nereagoval na radioterapii. To vše poukazovalo na žlázový nádor – vzácný

adenokarcinom – což se také později potvrdilo. Osm měsíců po diagnostikování nádoru Henrietta Lacks zemřela (Masters, 2002).

Během několika let se začaly HeLa buňky používat po celém světě jako laboratorní model rakovinné buňky, čehož lze využít při výzkumu rakoviny. Ale nejen to, HeLa buňky se běžně využívají k biomedicínskému výzkumu biochemických drah v normálních, ale i patologických buňkách lidského těla, k identifikaci genů a chromozomů v somatických buněčných hybridních kontrolujících kancerogenitu v děložnímčípku (Lichy a kol., 1992; Stanbridge a kol., 1981), atd.

Obecně platí, že lidský nádor rostoucí v kultuře permanentně je řazen do skupiny buněčných linií, které získaly důležité fenotypové a genotypové změny. Přestože bylo postupně izolováno několik dalších buněčných linií z různých typů lidských nádorů, HeLa buňky jsou stále nejpoužívanější lidské buněčné linie (Masters, 2002).

#### **1.4.2 Caco-2 buňky**

Caco-2 buňky jsou rychle rostoucí buňky lidského původu izolované ze střevního karcinomu.

Buněčná linie Caco-2 buněk představuje důležitý *in vitro* experimentální model využívaný ke studiu střevní diferenciace. Tato buněčná linie byla izolována z relativně dobře diferencovaného nádoru a roste pomalu v nahých myších (Fogh a kol., 1977). Caco-2 buňky se diferencují spontánně, v závislosti na hustotě buněk (Pinto a kol., 1983). Jsou jedinečným modelem, který slouží k pochopení, jakým způsobem neoplastický proces zasahuje do regulace buněčné diferenciace (Pignata a kol., 1994). Kromě zmíněného jsou Caco-2 buňky využívány při studiu adherence probiotických, ale i patogenních mikroorganismů (Lee a kol., 2003).

#### **1.4.3 L929 buňky**

Buněčná linie L929 byla roku 1948 izolována z pojivové tkáně myši. Kmen L byl jednou z prvních buněčných linií, které se začaly kultivovat kontinuálně a byl získán z normálních podkožních a tukových buněk ze 100 dní starého myšního samce. Klon 929 byl uznán z 95. subkultury generace rodičovského kmene (<http://www.cicams.ac.cn/marker/cell%20lines/L929.htm>).

Buňky L929 nemají mezibuněčnou komunikaci jsou známé přítomností adhezních molekul (<http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?key=L929>).

## 1.5 Cíle práce

- 1) Sledování závislosti kinetiky a dynamiky adherence prokaryotních buněk (*Lactobacillus mucosae* D a *Staphylococcus aureus*) na eukaryotní buněčné linii (Caco-2) a vzájemné interakce bakteriálních kmenů
  - *In vitro* kultivace eukaryotních savčích buněk
    - HeLa buňky
    - Caco-2 buňky
    - L929 buňky
  - Kultivace bakteriálních kultur
    - *Lactobacillus mucosae* D
    - *Staphylococcus aureus* CCM 4516
  - Kokultivace eukaryotních a prokaryotních buněčných populací
  - Příprava trvalých preparátů
  - Vyhodnocování pomocí optické mikroskopie a statistická analýza výsledků
  
- 2) Studium interakce prokaryotních a eukaryotních buněk různými zobrazovacími metodami
  - *In vitro* kultivace eukaryotních buněk (HeLa, Caco-2 a L929 buňky)
  - Kultivace bakteriálních kultur (*Lactobacillus mucosae* D a *Staphylococcus aureus* CCM 4516)
  - Kokultivace eukaryotních a prokaryotních buněčných populací
  - Příprava preparátů pro skenovací elektronovou mikroskopii (SEM) a skenovací elektronovou mikroskopii s pulzním polem (FESEM)
  - Mikrokinematografické zobrazení vazby mezi prokaryotní a eukaryotní buňkou
  
- 3) Studium vlivu odstranění proteinových struktur na interakci prokaryotní (*Lactobacillus mucosae* D) a eukaryotní buňky (HeLa, Caco-2 a L929 buňky)
  - *In vitro* kultivace eukaryotních buněk
  - Kultivace (*Lactobacillus mucosae* D)
  - Opracování povrchu bakteriálních buněk proteolytickými enzymy (trypsin, pronáza E, proteináza K)
  - Kokultivace eukaryotních a prokaryotních buněčných populací

- Příprava trvalých preparátů
- Vyhodnocování pomocí optické mikroskopie a statistická analýza výsledků

## 2 Materiál a metodika

### 2.1 Kultivační média, chemikálie a přístrojová technika

#### 2.1.1 Média

Ke kultivaci *Lactobacillus mucosae* D byla použita živná půda MRS (pH 6,0–6,4; de Man, Rogosa, Sharpe; Oxoid, Velká Británie) obohacená o roztok 5 % chloridu cysteinu (Sigma, Německo) v množství 0,1 ml na 1,0 ml (viz. Tab. V).

**Tab. V:** Složení tekuté půdy MRS.

SLOŽENÍ	MNOŽSTVÍ V 1 L
CH <sub>3</sub> COONa*3H <sub>2</sub> O	5,00 g
Citrát triamonný	2,00 g
Glukóza	20,00 g
Kvasničný autolyzát	4,00 g
„Lab-Lemco“ (masový) extrakt	8,00 g
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,20 g
MnSO <sub>4</sub> *4H <sub>2</sub> O	0,05 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,00 g
Pepton	10,00 g
Tween 80	1,00 ml

Ke kultivaci *Staphylococcus aureus* byl použit živný bujón č. 2 (pH 6,8–7,2; Imuna, Šarišské Michaľany, SR) (viz. Tab. VI).

**Tab. VI:** Složení živného bujónu č. 2.

SLOŽENÍ	MNOŽSTVÍ V 1 L
Hovězí vývar (sušina)	5,00 g
NaCl	2,50 g
Pepton	5,00 g
Živný základ č. 1	6,25 g
Živný základ č. 2	6,25 g

HeLa buňky a Caco-2 buňky byly kultivovány v MEM médiu („Minimal Essential Medium Eagle“; pH 7,0–7,5 ; PAA, Rakousko), které bylo obohaceno o neesenciální aminokyseliny, fetální bovinní sérum, L-glutamin a antibiotika(vše PAA, Rakousko) (viz. Tab. VII).

**Tab. VII:** Složení obohaceného MEM média.

SLOŽENÍ	MNOŽSTVÍ V 1 L
Amfotericin B	0,25 µg/ml
CaCl <sub>2</sub>	200,00 mg
Červený fenol	11,00 mg
D-glukóza	1000,00 mg
D-pantotenát vápenatý	1,00 mg
Fetální bovinní sérum	10% (v/v)
Chlorid cholinu	1,00 mg
Chlorid L-argininu	126,00 mg
Chlorid L-lyzínu	72,00 mg
Chlorid pyridoxalu	1,00 mg
KCl	400,00 mg
Kyselina L-asparágová	13,30 mg
Kyselina L-glutamová	14,70 mg
Kyselina listová	1,00 mg
L-alanin	8,90 mg
L-asparagin	13,20 mg
L-cystein	24,00 mg
L-fenylalanin	32,00 mg
L-glutamin	292,30 mg
L-glycin	7,50 mg
L-izoleucin	52,00 mg
L-leucin	52,00 mg
L-metionin	15,00 mg
L-prolin	11,50 mg
L-serin	10,50 mg
L-treonin	48,00 mg

L-tryptofan	10,00 mg
L-tyrozin	36,00 mg
L-valin	46,00 mg
MgSO <sub>4</sub>	97,70 mg
Monohydrát chloridu L-histidinu	42,00 mg
Myoinozitol	2,00 mg
NaCl	6800,00 mg
NaHCO <sub>3</sub>	2200,00 mg
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	140,00 mg
Nikotinamid	1,00 mg
Penicilin	100 I.U./ml
Riboflavin	0,10 mg
Streptomycin	0,10 mg/ml
Tiamin chlorid	1,00 mg

Ke kultivaci L929 buněk bylo použito obohacené DMEM médium („Dulbecco’s modified Eagle’s Medium; pH 6,8–7,5, PAA, Rakousko). DMEM médium obsahovalo antibiotika a bylo obohaceno o glukózu (4,5 g/l), fetální bovinní sérum a L-glutamin (vše PAA Rakousko) (viz. Tab. VIII).

**Tab. VIII:** Složení obohaceného DMEM média.

SLOŽENÍ	MNOŽSTVÍ V 1 L
FeN <sub>3</sub> O <sub>9</sub> *9H <sub>2</sub> O	0,10 mg
Glycin	30,00 mg
Chlorid cholinu	4,00 mg
KCl	400,00 mg
D-pantotenát vápenatý	4,00 mg
Kyselina listová	4,00 mg
L-arginin*HCl	84,00 mg
L-cystein	48,00 mg
L-fenylalanin	66,00 mg
L-histidin*HCl*H <sub>2</sub> O	42,00 mg
L-izoleucin	105,00 mg

L-leucin	105,00 mg
L-lyzin*HCl	146,00 mg
L-metionin	30,00 mg
L-serin	42,00 mg
L-treonin	95,00 mg
L-tryptofan	16,00 mg
L-tyrozin	72,00 mg
MgSO <sub>4</sub>	97,70 mg
Myoinozitol	7,20 mg
NaCl	6400,00 mg
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	125,00 mg
NaHCO <sub>3</sub>	3700, 00 mg
Nikotinamid	4,00 mg
Pyridoxal chlorid	4,00 mg
Riboflavin	0,40 mg
Tiamin chlorid	4,00 mg

### 2.1.2 Chemikálie a složení roztoků

- Sterilní roztok PBS – fosfátový pufovaný fyziologický roztok (NaCl 8,0 g/l, KCl 0,2 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*12H<sub>2</sub>O 2,89 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 g/l; pH 7,3)
- 3 % glutaraldehyd ve fosfátovém pufru (vzniká smícháním 4 dílů roztoku A a 1 dílu roztoku B; pH 7,2)
  - Roztok A: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*12H<sub>2</sub>O 71,56 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O 35,6 g/l
  - Roztok B: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 27,2 g/l
- 0,2 mol/l fosfátový pufr (pH 7,2)
- 50 % etanol
- 70 % etanol
- Barvivo May-Grünwald (Penta, Česká republika)
- Barvivo Giemsa-Romanowski (Penta, Česká republika)
- Směs kyseliny octové (Penta, Česká republika) a metanolu (Analytical Lab Science, Thajsko) v poměru 1:3
- Aceton (Penta, Česká republika)
- Aceton:xylén v poměrech 1:1, 1:2, 1:4



- Xylén (Lach-Ner s.r.o., Česká republika)
- Trypsin (1 mg/ml) (PAA, Rakousko)
- Pronáza E (1 mg/ml) (Merck KGaA, Německo)
- Proteináza K (1 mg/ml) (Merck KGaA, Německo)
- Destilovaná voda

### 2.1.3 Přístroje

- Centrifuga: Jouan BR4, multifunction centrifuge, Thermo Electron Corporation, Francie
- Mikrocentrifuga: MiniSpin, Eppendorf, Německo
- Densitometr: Densi LA meter II, EMO, Česká republika
- Flowbox 1: Labox, Microbiological safety cabinets, Typ Bio 126, Česká republika
- Flowbox 2: Holten LaminAir, model 1,5, Thermo Electron Corporation, Francie
- Flowbox 3: LABOX BHL96
- Vortex : Lab dancer, IKA-Werke, Německo
- Termostat na bakteriální kultury: Liebherr, TS 606, Německo
- Termostat na buněčné kultury: Steri-cycle CO<sub>2</sub> incubator, HEPA class 100, model 381, Thermo Electron Corporation, USA
- Skenovací elektronový mikroskop: Jeol JSM-7401F Field Emission Scanning Electron Microscope, Japonsko
- Digitální fotoaparát na mikroskopické snímky: Canon PowerShot G6, Canon, Japonsko
- Digitální fotoaparát na mikrokinematografii: Olympus C7070WZ, Olympus, Japonsko

## 2.2 Použité mikroorganismy a buněčné linie

### 2.2.1 Bakteriální kultury

#### 2.2.1.1 Původ bakteriálních kultur

Bakteriální kmen *Staphylococcus aureus* CCM 4516 byl zakoupen z České sbírky mikroorganismů („Czech Collection of Microorganisms“, Brno). Bakteriální kmen *Lactobacillus mucosae* D pocházel ze žaludeční sliznice jehněte (chovná stanice Očová, SR) a byl získán z Katedry buňkové a molekulární biologie léčiv (Farmaceutická fakulta, Univerzita Komenského v Bratislavě, SR).

### 2.2.1.2 Kultivace bakterií

*Lactobacillus mucosae* D byl kultivován 24 h v tekuté MRS půdě za anaerobních podmínek při 37 °C. *Staphylococcus aureus* CCM 4516 byl kultivován 24 h v živném bujónu při 37 °C.

### 2.2.1.3 Příprava bakteriálních suspenzí

Bakteriální kultury byly ředěny pomocí denzitometru na počet  $1,5 \times 10^8$  CFU/ml v médiu příslušné buněčné linie bez přidání antibiotik.

## 2.2.2 Tkáňové kultury a jejich původ

Ke studiu adhezivity a interakce prokaryot byly použity tři typy buněčných linií, jakožto zástupci eukaryotických buněk. Jednalo se o HeLa buňky (ECACC93021013; „European Collection of Cell Cultures“, Sigma-Aldrich, Německo), které jsou schopné neustálého dělení, jsou nenáročné na kultivační podmínky, rychle rostou a jedná se o epitelální buňky. Dále byly použity Caco-2 buňky (ECACC 86010202; Sigma-Aldrich, Německo), které jsou taktéž schopné neustálého dělení, jsou využívány k analýzám *in vitro* – v tomto případě k určení míry adherence laktobacilů a stafylokoků na jejich povrch. Caco-2 buňky jsou stejně jako HeLa buňky epitelální. V poslední řadě byly použity L-929 buňky (Laboratoř tkáňových kultur, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeská Univerzita, České Budějovice), které představovaly zástupce fibroblastoidních buněk, snadno se kultivují.

### 2.2.2.1 Kultivace buněk HeLa, Caco-2 a L929

HeLa buňky byly pasážovány po 48 hodinách a kultivovány v obohaceném MEM médiu v 5 % atmosféře CO<sub>2</sub> při 37 °C.

Caco-2 buňky byly pasážovány 2x týdně a kultivovány v obohaceném MEM médiu v 5 % atmosféře CO<sub>2</sub> při 37 °C.

L929 buňky byly pasážovány 3x týdně a kultivovány v obohaceném DMEM médiu v 5 % atmosféře CO<sub>2</sub> při 37 °C.

Následně byly kultury v experimentech nasazeny do 24 jamkových panelů (Greiner, Německo) na krycí sklička (PAA, Rakousko).

### 2.3 Opracování *Lactobacillus mucosae* D proteolytickými enzymy

Na adhezivitě laktobacilů na povrch buněk se podílí různé povrchové komponenty. Hlavní úlohu hrají povrchové proteiny laktobacilů, které představují nejvýznamnější a nejpočetnější adhezní molekuly.

Po kultivaci následovalo opracování povrchu buněk, resp. povrchových proteinů laktobacilů, trypsinem, pronázou E a proteinázou K. Enzymy byly použity v koncentraci 1 mg/ml, přičemž trypsin a pronáza E byly rozpuštěny ve sterilním PBS a proteináza K ve vodě. Takto připravené enzymy byly přidány v množství 1 ml k bakteriální kultuře *L. mucosae* D a kultivace probíhala 1 h při 37 °C.

Po opracování povrchových proteinů proteolytickými enzymy byla kultura laktobacilů dvakrát propláchnuta sterilním roztokem PBS a přidávána k HeLa, Caco-2 a L929 buňkám v množství  $1,5 \times 10^8$  CFU/ml. Inkubace probíhala 1, 8 a 24 h při 37 °C v 5 % atmosféře CO<sub>2</sub>.

Fixace, barvení odvodnění bylo provedeno způsobem uvedeným v kapitole 2.5.2.

### 2.4 Koinkubace Caco-2 buněk s *Lactobacillus mucosae* D a *Staphylococcus aureus*

Bakteriální kultury byly přidávány ke Caco-2 buňkám v množství  $1,5 \times 10^8$  CFU/ml a koinkubovány po dobu 2 h při 37 °C v 5 % atmosféře CO<sub>2</sub>. V prvním případě jsme sledovali, jak testovaný kmen laktobacila odolával vytlačování *S. aureus* (v dalším textu uvádíme pod termínem test vytěsnění). Nejprve byly inkubovány s *L. mucosae* D po dobu 2 h, poté byly buňky dvakrát propláchnuty sterilním roztokem PBS a na závěr byly buňky inkubovány s *S. aureus*, taktéž 2 h. V druhém případě jsme zjišťovali jak je schopen *L. mucosae* D vytlačovat z vazebných míst *S. aureus* (v dalším textu uváděno pod termínem test vyloučení). Eukaryotní buňky byly inkubovány s *S. aureus* 2 h, dvakrát propláchnuty sterilním roztokem PBS a poté byly inkubovány další 2 h s *L. mucosae* D. V posledním případě jsme sledovali schopnost obou bakteriálních kmenů soutěžit o vazebná místa na povrchu eukaryotních buněk (tento test v dalším textu uvádíme jako test soutěžení). V tomto posledním případě byly oba bakteriální kmeny přidávány k buněčné línii zároveň a koinkubace trvala po dobu 2 h.

## 2.5 Příprava preparátů pro optickou mikroskopii

### 2.5.1 Úvod

Míra adhezivity *L. mucosae* D a *S. aureus* na povrch Caco-2 buněk byla kvantifikována pomocí optické mikroskopie. Stejným způsobem byla vyhodnocována také míra adhezivity testovaných bakteriálních kmenů předem opracovaných trypsinem, pronázou E a proteinázou K. Na barvení vzorků byla použita barviva May-Grünwald a Giemsa-Romanowski, která jsou určena především k diagnostice *in vitro*. Barvivo May-Grünwald barví jádra a krevní buňky. Jedná se o saturovaný roztok eosinu v methylenové modři přidané do metanolu. Barvivo Giemsa-Romanowski se používá k barvení periferní krve a výtěrů kostní dřeně. Z toho důvodu se používá ke studiu morfologie červených krvinek. Nejdůležitějšími složkami barviva jsou methylenová modř, azur B a eosin Y. Methylenová modř a azur B barví jádra různými odstíny modré až fialové. Eosin Y barví cytoplazmu buněk oranžovou až růžovou barvou. Jedná se o neutrální barvivo, které v našem případě barví hlavně jádra.

### 2.5.2 Fixace, barvení, odvodňování

Buňky byly dvakrát opláchnuty sterilním roztokem PBS a fixovány přidáním směsi kyseliny octové a metanolu v poměru 1:3 na 10 min. Směs byla po této době odsáta a sklíčka byla před dalším zpracováním ponechána k oschnutí v šikmé poloze, aby nepřischla ke dnu jamky.

Po úplném oschnutí byly preparáty barveny pomocí barviva May-Grünwald a barviva Giemsa-Romanowski. Nejprve byla sklíčka zatopena přefiltrovaným barvivem May-Grünwald, ponechána 5 min na minishakeru a následně opláchnuta destilovanou vodou. Barvivo Giemsa-Romanowski bylo naředěno destilovanou vodou v poměru 1:13 a přefiltrováno přes vat. Takto připravené a naředěné barvivo bylo vneseno pipetou do jamek na buňky, panýlek položen na minishaker na 7 min a opět opláchnut destilovanou vodou. Sklíčka byla znovu sušena v šikmé poloze.

Po usušení byly vzorky odvodňovány v aceton-xylenové řadě: aceton, aceton:xylen v poměrech 1:1, 1:2, 1:4 a nakonec xylen, pokaždé po dobu 5 min. Po vyjmutí z xylenu byl vzorek ihned nalepen pomocí kanadského balzámu na podložní sklíčko.

## 2.6 Vyhodnocování preparátů

Míra adhezivity laktobacilů a stafylokoků na povrch Caco-2 buněk byla vyhodnocována pomocí optické mikroskopie, stejně jako míra adhezivity laktobacilů, opracovaných trypsinem, pronázou E a proteinázou K, na povrch HeLa, Caco-2 a L929 buněk. Pro kvantifikaci bylo počítáno, kolik z 1000 Caco-2 (HeLa a L929) buněk mělo na svém povrchu naadherovanou alespoň jednu bakteriální buňku. Tyto výsledky byly poté statisticky vyhodnoceny pomocí Studentova t-testu pro porovnání dvou nezávislých hodnot.

## 2.7 Mikrokinematografické zobrazení vazby mezi prokaryotní a eukaryotní buňkou

Pro mikrokinematografické zobrazení vazby mezi prokaryotní a eukaryotní buňkou byly použity kmeny *L. mucosae* D a *S. aureus* a kultura Caco-2 buněk.

Do Petriho misky, na jejíž dně byla kultura Caco-2 buněk, byly nanесeny bakteriální suspenze *L. mucosae* D a *S. aureus* v počtu  $5 \times 10^4$  CFU/ml v obohaceném MEM médiu. Snímky byly pořizovány po dobu 24 h každé dvě minuty v optickém mikroskopu.

## 2.8 Skenovací elektronová mikroskopie

### 2.8.1 Úvod

Pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM) byla studována morfologie Caco-2 buněk, bakterií a jejich vzájemná interakce. Jednou z největších předností SEM je velká hloubka zaostření. Při zvětšeních porovnatelných s optickým mikroskopem (např. 1000) má SEM hloubku zaostření 100x větší než optický mikroskop. Dalšími výhodami SEM je vynikající kontrast obrazu a relativně nenáročná příprava vzorků při zobrazování povrchů.

Pro podrobnější zkoumání morfologie je využívána také skenovací elektronová mikroskopie s pulzním polem („Field Emission Scanning Electron Microscopy“, FESEM). Na rozdíl od klasického SEM se zde využívá tzv. studený zdroj elektronů. Jelikož je proud elektronů produkovaný v emisním poli přibližně 1000x menší než v klasickém mikroskopu, je výsledný obraz kvalitnější (Reichelt, 2007). Zachytávání sekundárních elektronů pomocí dvou detektorů shora a z boku se v obraze projeví větším rozlišením, hloubkou ostroty a kontrastem (Operation Instruction Guide JSM-7401F).

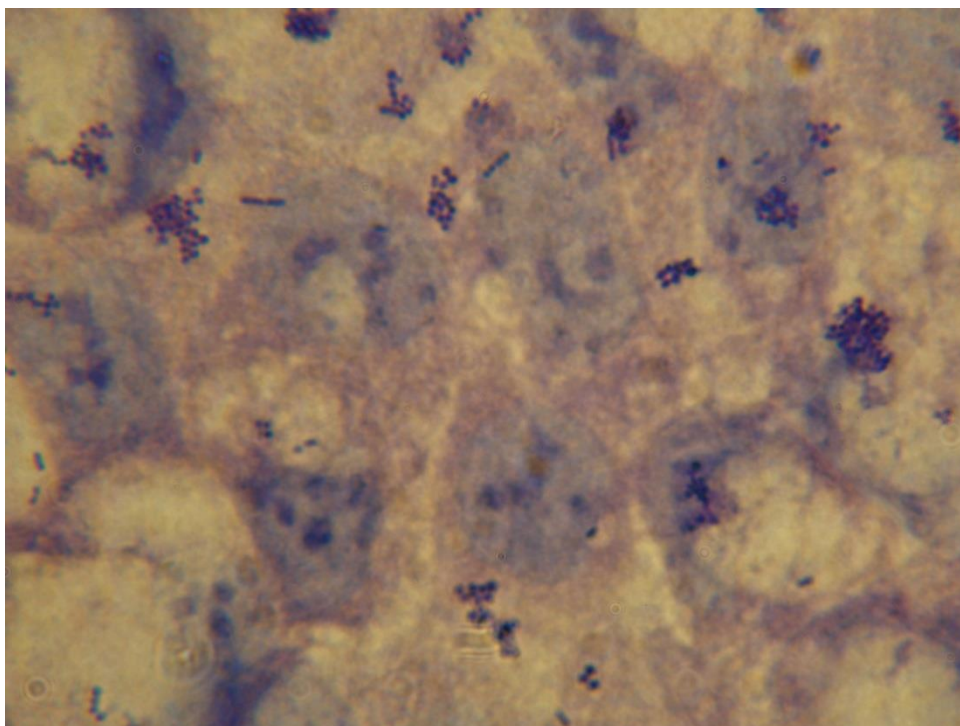
### **2.8.2 Koinkubace Caco-2 buněk s *L. mucosae* D a *S. aureus***

Bakteriální kultury *L. mucosae* D a *S. aureus* byly přidávány ke Caco-2 buňkám v množství  $1,5 \times 10^8$  CFU/ml a inkubovány po dobu 2 a 4 h. Buňky byly dvakrát opláchnuty sterilním roztokem PBS a fixovány 3 % glutaraldehydem ve fosfátovém pufru nejprve 20 min, poté 60 min. Následně byly vzorky vypírány 0,2 mol/l fosfátovým pufrům (pH 7,2) třikrát po deseti minutách. Na závěr bylo provedeno odvonění 3x po 10 min 50 % etanolem a 3x po 10 min 70 % etanolem. Po posledním proplachu byly preparáty zality dostatečným množstvím 70 % etanolu, panel byl utěsněn parafilmem a vzorky byly dále zpracovány v Laboratoři elektronové mikroskopie v Českých Budějovicích.

### 3 Výsledky

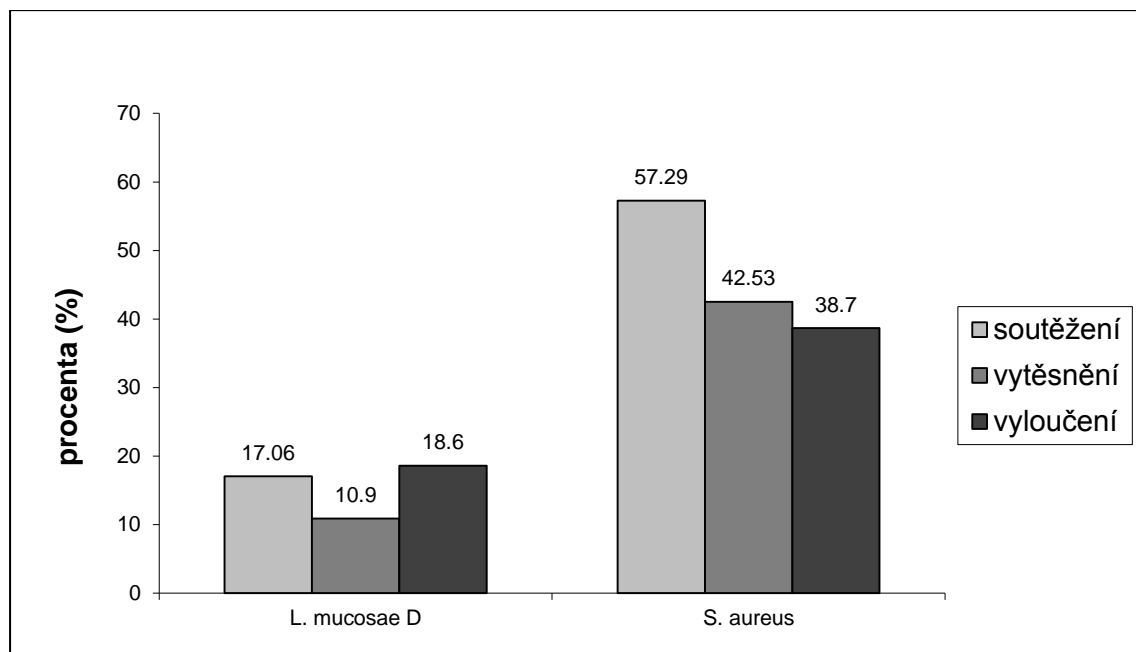
#### 3.1 Vliv *Lactobacillus mucosae* D na adherenci *Staphylococcus aureus* na povrch eukaryotní buňky

Míru adhezivitu kmenů *L. mucosae* Da *S. aureus* (prokaryotní organismy) ke Caco-2 buňkám (eukaryotní buňky) jsme hodnotili pomocí optické mikroskopie (Obr. 1). Hodnotili jsme, kolik eukaryotních buněk mělo na svém povrchu naadherovanou alespoň jednu buňku *L. mucosae* D a kolik jich mělo na svém povrchu alespoň jednu buňku *S. aureus*.



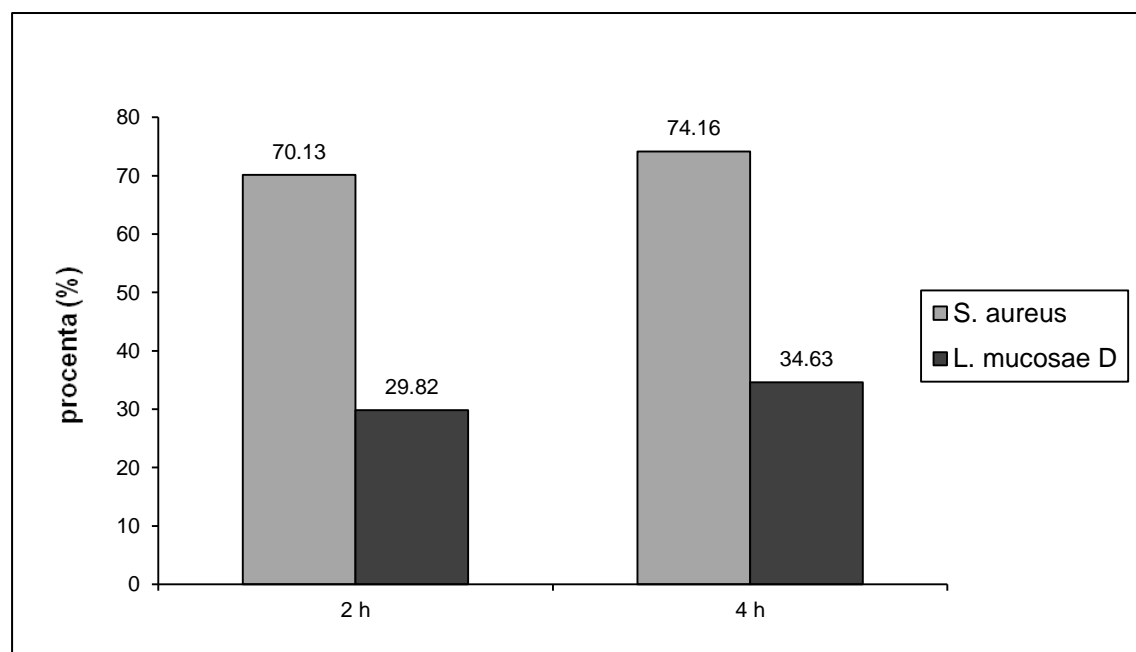
**Obr. 1:** Buňky *L. mucosae* D a *S. aureus* naadherované na Caco-2 buňky. (Zvětšení mikroskopu 1000x)

Pro porovnání míry adherence dvou bakteriálních kmenů na povrch Caco-2 buněk jsme zaznamenané hodnoty vyjádřili procentuálně (Obr. 2). Ve všech případech byl schopen lépe adherovat *S. aureus*. Největší schopnost *L. mucosae* D konkurovat *S. aureus* byl u testu vytěsnění. V případě *S. aureus* jsme největší míru adherence zaznamenali v testu soutěžení (57,29 %). *L. mucosae* D měl největší schopnost adherovat v případě vytěsnění (18,60 %).



**Obr. 2:** Procento Caco-2 buněk adherovaných s bakteriálním kmenem po testu soutěžení, vytěsnění, vyloučení, porovnání jednotlivých kmenů.

Pro porovnání míry adherence jednotlivých bakteriálních kmenů na povrch Caco-2 buněk jsme provedli kultivaci Caco-2 buněk též s čistou kulturou *L. mucosae* D a *S. aureus* (Obr. 3). Hodnocení probíhalo po 2 a 4 h kultivace. Stejně jako při kokultivaci jsme vyšší míru adherence zaznamenali u *S. aureus*. Oba kmeny měly vyšší míru adherence po delší době kokultivace (4 h), *S. aureus* (74,16 %), *L. mucosae* D (34,63 %).





**Obr. 3:** Procento Caco-2 buněk adherovaných s bakteriálním kmenem v čisté kultuře, porovnání jednotlivých kmenů.

Použitím Studentova t-testu pro porovnání dvou nezávislých hodnot jsme určovali, zda jsou rozdíly mezi vybranými prokaryotními kmeny ve své schopnosti adherovat na povrch Caco-2 buněk v jednotlivých modifikacích testu statisticky významné nebo nevýznamné.

V tabulce IX jsme porovnávali, zda se statisticky signifikantně lišila adhezivita *L. mucosae* D ve třech různých testech, a to soutěžení, vyloučení a vytěsnění. Zjistili jsme, že mezi testem soutěžení a vyloučení statistický rozdíl nebyl. To znamená, že přidání obou kmenů naráz, nebo nejdříve *L. mucosae* D a následně *S. aureus*, nemá signifikantní vliv na adhezenci laktobacila. Oproti tomu, v případě testu vyloučení a vytěsnění, stejně jako u testu vytěsnění a soutěžení, byla míra adherence statisticky významně odlišná (Tab. IX).

**Tab. IX:** Statistické porovnání (Studentův t-test pro porovnání rozdílu dvou nezávislých hodnot) míry adherence *L. mucosae* D v testu soutěžení, vyloučení a vytěsnění s *S. aureus*.

<b>D</b>	D+Sa	D+Sa		
	SaD	***	SaD	
	DSa	ns	***	DSa

ns – nesignifikantní rozdíl; \*\*\* – statisticky vysoce signifikantní rozdíl ( $p < 0,001$ ); D+Sa – test soutěžení; DSa – test vytěsnění; SaD – test vyloučení.

V tabulce X jsme porovnávali adhezivitu *S. aureus* ve stejných parametrech, jako ve výše popsaném případě *L. mucosae* D. V míře adherence *S. aureus* v testech soutěžení a vyloučení, stejně jako v testu soutěžení a vytěsnění byl statisticky významný rozdíl. Naopak v případě testu vyloučení a vytěsnění statistický rozdíl nebyl, což naznačuje, že přidání *L. mucosae* D před nebo po *S. aureus* nemá vliv na míru jeho adherence (Tab. X).

**Tab. X:** Statistické porovnání (Studentův t-test pro porovnání rozdílu dvou nezávislých hodnot) míry adherence *S. aureus* v testu soutěžení, vyloučení a vytěsnění s *L. mucosae* D.

<b>Sa</b>	D+Sa	D+Sa		
	SaD	***	SaD	
	DSa	***	ns	DSa

ns – nesignifikantní rozdíl; \*\*\* – statisticky vysoce signifikantní rozdíl ( $p < 0,001$ ); D+Sa – test soutěžení; DSa – test vytěsnění; SaD – test vyloučení.

Tabulky XI, XII a XIII popisují, jak se lišila adherence obou testovaných kmenů na povrch Caco-2 buněk ve třech různých testech, konkrétně testu soutěžení, testu vytěsnění a testu vyloučení. Ve všech třech případech se míra adherence bakteriálních kmenů statisticky signifikantně lišila (Tab. XI; Tab. XII; Tab. XIII).

**Tab. XI:** Statistické porovnání (Studentův t-test pro porovnání rozdílu dvou nezávislých hodnot) rozdílů adherence bakteriálních kmenů v testu soutěžení.

<b>D+Sa</b>	Sa	Sa	
	D	***	D

\*\*\* – statisticky vysoce signifikantní rozdíl ( $p < 0,001$ ).

**Tab. XII:** Statistické porovnání (Studentův t-test pro porovnání rozdílu dvou nezávislých hodnot) rozdílů adherence bakteriálních kmenů v testu vyloučení.

<b>SaD</b>	Sa	Sa	
	D	***	D

\*\*\* – statisticky vysoce signifikantní rozdíl ( $p < 0,001$ ).

**Tab. XIII:** Statistické porovnání (Studentův t-test pro porovnání rozdílu dvou nezávislých hodnot) rozdílů adherence bakteriálních kmenů v testu vytěsnění.

<b>DSa</b>	Sa	Sa	
	D	***	D

\*\*\* – statisticky vysoce signifikantní údaj ( $p < 0,001$ ).

## 3.2 Úloha povrchových proteinů laktobacilů v adherenci na povrch eukaryotních buněk

### 3.2.1 Úvod

Na adhezivě laktobacilů na povrch buněk se podílí různé povrchové komponenty, ale nejvýznamnější úlohu hrají povrchové proteiny. Povrchových proteinů bylo identifikováno několik druhů, např. proteiny povrchové vrstvy (tzv. „S-layer“), skupina proteinů s motivem LPXTG v primární sekvenci, nezakotvené housekeeping proteiny,

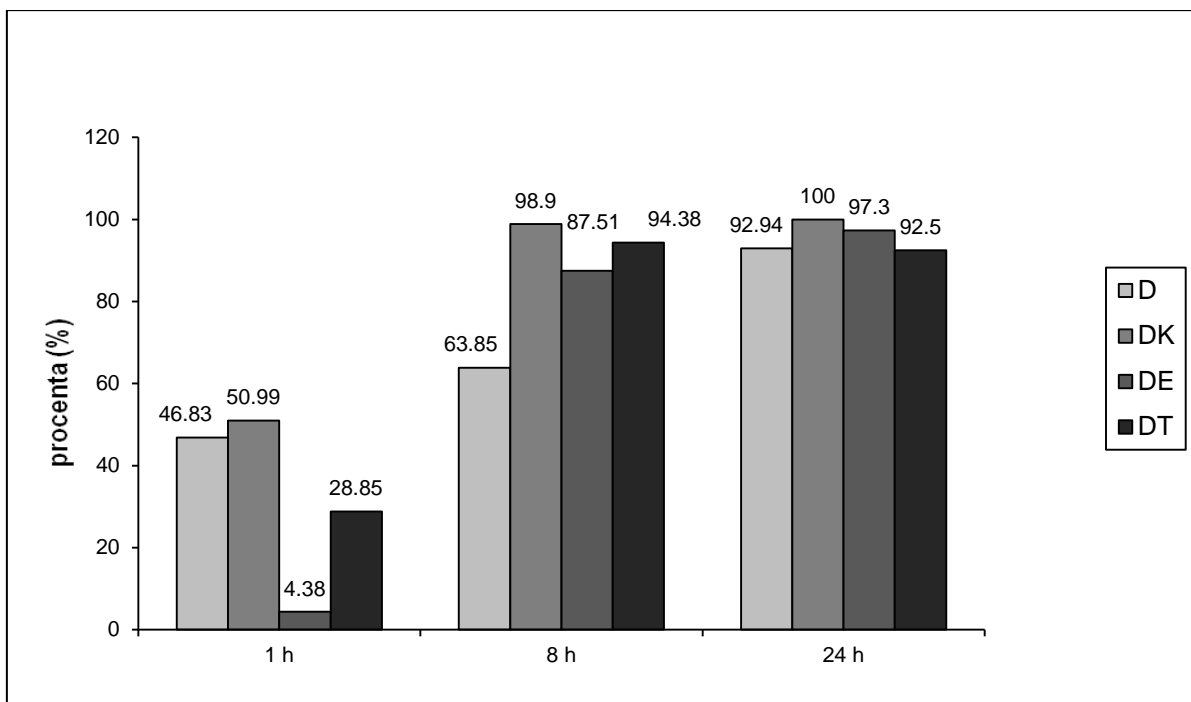
transportní proteiny a také proteiny, které nepatří do žádné ze zmiňovaných proteinových skupin (Antikainen a kol., 2009).

Míru adhezivitu *L. mucosae* D opracovaného pronázou E, proteinázou K a trypsinem (prokaryotický organismus) k HeLa, Caco-2 a L929 buňkám (eukaryotní buňky) jsme hodnotili po 1, 8 a 24 h koinkubace pomocí optické mikroskopie a vyhodnocovali statisticky. Pro porovnání jsme koinkubaci provedli též s neopracovanými bakteriálními buňkami.

Po první hodině kultivace měly laktobacily nejnižší schopnost adherence ve všech případech. Domníváme se, že tato doba byla nedostatečná na obnovu povrchových proteinových struktur zodpovědných za adherenci. Po osmi hodinách bakteriální buňky obnovily své povrchové proteiny natolik, že se míra adherence významně zvýšila. Proteolyticky neopracované buňky laktobacilů zvyšovaly množství svých povrchových proteinů v čase postupně, na rozdíl od laktobacilů opracovaných nespecifickými enzymy.

### **3.2.2 Míra adhezivitu *L. mucosae* D na povrch HeLa buněk**

Pro porovnání míry adherence *L. mucosae* D opracovaného nespecifickými proteolytickými enzymy na povrch HeLa buněk jsme zaznamenané hodnoty vyjádřili procentuálně (Obr. 4). Nejvyšší míru adherence jsme zaznamenali v případě *L. mucosae* D opracovaného proteinázou K po 24 h (100,00 %). Nejmenší schopnost adherovat měl *L. mucosae* D opracovaný pronázou E po 1 h (4,38 %). Nejvyšší míru adherence měl neopracovaný *L. mucosae* D po 24 h (92,94 %). *L. mucosae* D opracovaný proteinázou K měl nejlepší schopnost adherovat po 24 h (100,00 %). *L. mucosae* D opracovaný pronázou E měl nejvyšší míru adherence po 24 h (97,30 %). *L. mucosae* D opracovaný trypsinem nejlépe adheroval po 8 h (94,38 %).



**Obr. 4:** Procento HeLa buněk adherovaných s bakteriálním kmenem, porovnání v jednotlivých časech. D – *L. mucosae* D, kontrola; DK – *L. mucosae* D opracovaný proteinázou K; DE – *L. mucosae* D opracovaný pronázou E; DT – *L. mucosae* D opracovaný trypsinem.

Použitím Studentova t-testu pro porovnání dvou nezávislých hodnot jsme určovali, zda jsou rozdíly mezi *L. mucosae* D opracovaným různými proteolytickými enzymy ve své schopnosti adherovat na povrch HeLa-2 buněk statisticky významné nebo nevýznamné.

Porovnávali jsme, zda se statisticky významně lišila adhezivita *L. mucosae* D opracovaného různými proteolytickými enzymy v první hodině. Zjistili jsme, že mezi mírou adherence neopracovaného *L. mucosae* D a *L. mucosae* D opracovaného proteinázou K nebyl statisticky významný rozdíl. Ve všech ostatních případech byla míra adherence statisticky významně odlišná (Tab. XIV).

**Tab. XIV:** Statistické porovnání (Studentův t-test pro porovnání rozdílu dvou nezávislých hodnot) míry adherence *L. mucosae* D na povrch HeLa buněk po 1 h inkubace.

<b>1 h</b>	D	D			
	DE	***	DE		
	DK	ns	***	DK	
	DT	***	***	***	DT

ns – nesignifikantní rozdíl; \*\*\* – statisticky vysoce signifikantní údaj ( $p < 0,001$ ); D – *L. mucosae* D, kontrola; DK – *L. mucosae* D opracovaný proteinázou K; DE – *L. mucosae* D opracovaný pronázou E; DT – *L. mucosae* D opracovaný trypsinem

Totéž jsme porovnávali v osmé hodině inkubace. Zjistili jsme, že ve všech případech byla míra adherence statisticky významně odlišná (Tab. XV).

**Tab. XV:** Statistické porovnání (Studentův t-test pro porovnání rozdílů dvou nezávislých hodnot) míry adherence *L. mucosae* D na povrch HeLa buněk po 8 h inkubace.

<b>8 h</b>	D	D			
	DE	***	DE		
	DK	***	***	DK	
	DT	***	***	***	DT

\*\*\* – statisticky vysoce signifikantní údaj ( $p < 0,001$ ); D – *L. mucosae* D, kontrola; DK – *L. mucosae* D opracovaný proteinázou K; DE – *L. mucosae* D opracovaný pronázou E; DT – *L. mucosae* D opracovaný trypsinem

Stejně porovnání jsme prováděli i ve 24 h inkubace. V případě míry adherence *L. mucosae* D neopracovaného a *L. mucosae* D opracovaného trypsinem nebyl statisticky významný rozdíl. Ve všech ostatních případech byla míra adherence statisticky signifikantně rozdílná (Tab. XVI).

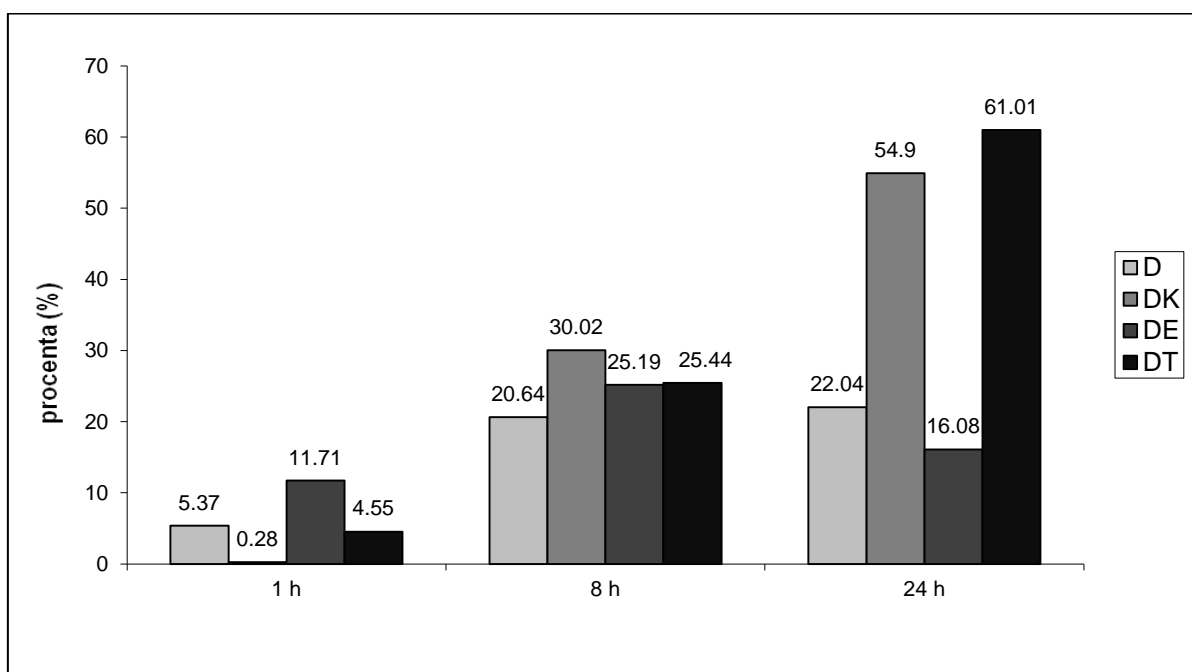
**Tab. XVI:** Statistické porovnání (Studentův t-test pro porovnání rozdílů dvou nezávislých hodnot) míry adherence *L. mucosae* D na povrch HeLa buněk po 24 h inkubace.

<b>24 h</b>	D	D			
	DE	***	DE		
	DK	***	***	DK	
	DT	ns	***	***	DT

ns – nesignifikantní rozdíl; \*\*\* – statisticky vysoce signifikantní údaj ( $p < 0,001$ ); D – *L. mucosae* D, kontrola; DK – *L. mucosae* D opracovaný proteinázou K; DE – *L. mucosae* D opracovaný pronázou E; DT – *L. mucosae* D opracovaný trypsinem

### 3.2.3 Míra adhezivity *L. mucosae* D na povrch Caco-2 buněk

Pro porovnání míry adherence *L. mucosae* D opracovaného proteolytickými enzymy na povrch Caco-2 buněk jsme zaznamenané hodnoty vyjádřili procentuálně (Obr. 5). Nejvyšší míru adherence jsme zaznamenali v případě *L. mucosae* D opracovaného trypsinem po 24 h (61,01 %). Nejmenší schopnost adherovat měl *L. mucosae* D opracovaný proteinázou K po 1 h (0,28 %). Nejvyšší míru adherence měl neopracovaný *L. mucosae* D po 24 h (22,04 %). *L. mucosae* D opracovaný proteinázou K měl nejlepší schopnost adherovat po 24 h (54,90 %). *L. mucosae* D opracovaný pronázou E měl nejvyšší míru adherence po 8 h (25,19 %). *L. mucosae* D opracovaný trypsinem nejlépe adheroval po 24 h (61,01 %).



**Obr. 5:** Procento Caco-2 buněk adherovaných s bakteriálním kmenem, porovnání v jednotlivých časech. D – *L. mucosae* D, kontrola; DK – *L. mucosae* D opracovaný proteinázou K; DE – *L. mucosae* D opracovaný pronázou E; DT – *L. mucosae* D opracovaný trypsinem.

Použitím Studentova t-testu pro porovnání dvou nezávislých hodnot jsme určovali, zda jsou rozdíly mezi *L. mucosae* D opracovaným různými proteolytickými enzymy ve své schopnosti adherovat na povrch Caco-2 buněk statisticky významné nebo nevýznamné.

Porovnávali jsme, zda se statisticky významně lišila míra adhezivity *L. mucosae* D opracovaného třemi proteolytickými enzymy v první hodině. Zjistili jsme, že mezi mírou adherence neopracovaného *L. mucosae* D a *L. mucosae* D opracovaného trypsinem nebyl

statisticky významný rozdíl. Ve všech ostatních případech byla míra adherence statisticky významně odlišná (Tab. XVII).

**Tab. XVII:** Statistické porovnání (Studentův t-test pro porovnání rozdílu dvou nezávislých hodnot) míry adherence *L. mucosae* D na povrch Caco-2 buněk opracovaného různými proteolytickými enzymy po 1 h inkubace.

<b>1h</b>	D	D			
	DE	***	DE		
	DK	***	***	DK	
	DT	ns	***	***	DT

ns – nesignifikantní rozdíl; \*\*\* – statisticky vysoce signifikantní údaj ( $p < 0,001$ ); D – *L. mucosae* D, kontrola; DK – *L. mucosae* D opracovaný proteinázou K; DE – *L. mucosae* D opracovaný pronázou E; DT – *L. mucosae* D opracovaný trypsinem

Totéž jsme porovnávali po 8 h inkubace. Statisticky signifikantní rozdíl byl ve všech případech, s výjimkou *L. mucosae* D opracovaného pronázou E a *L. mucosae* D opracovaného trypsinem, kde míra adherence nebyla statisticky významně odlišná (Tab. XVIII).

**Tab. XVIII:** Statistické porovnání (Studentův t-test pro porovnání rozdílu dvou nezávislých hodnot) míry adherence *L. mucosae* D na povrch Caco-2 buněk opracovaného různými proteolytickými enzymy po 8 h inkubace.

<b>8 h</b>	D	D			
	DE	***	DE		
	DK	***	***	DK	
	DT	***	ns	***	DT

ns – nesignifikantní rozdíl; \*\*\* – statisticky vysoce signifikantní údaj ( $p < 0,001$ ); D – *L. mucosae* D, kontrola; DK – *L. mucosae* D opracovaný proteinázou K; DE – *L. mucosae* D opracovaný pronázou E; DT – *L. mucosae* D opracovaný trypsinem

Stejně porovnání bylo provedeno i po 24 h inkubace. Statisticky významný rozdíl v míře adherence byl ve všech případech (Tab. XIX).

**Tab. XIX:** Statistické porovnání (Studentův t-test pro porovnání rozdílu dvou nezávislých hodnot) míry adherence *L. mucosae* D na povrch Caco-2 buněk opracovaného různými proteolytickými enzymy po 24 h inkubace.

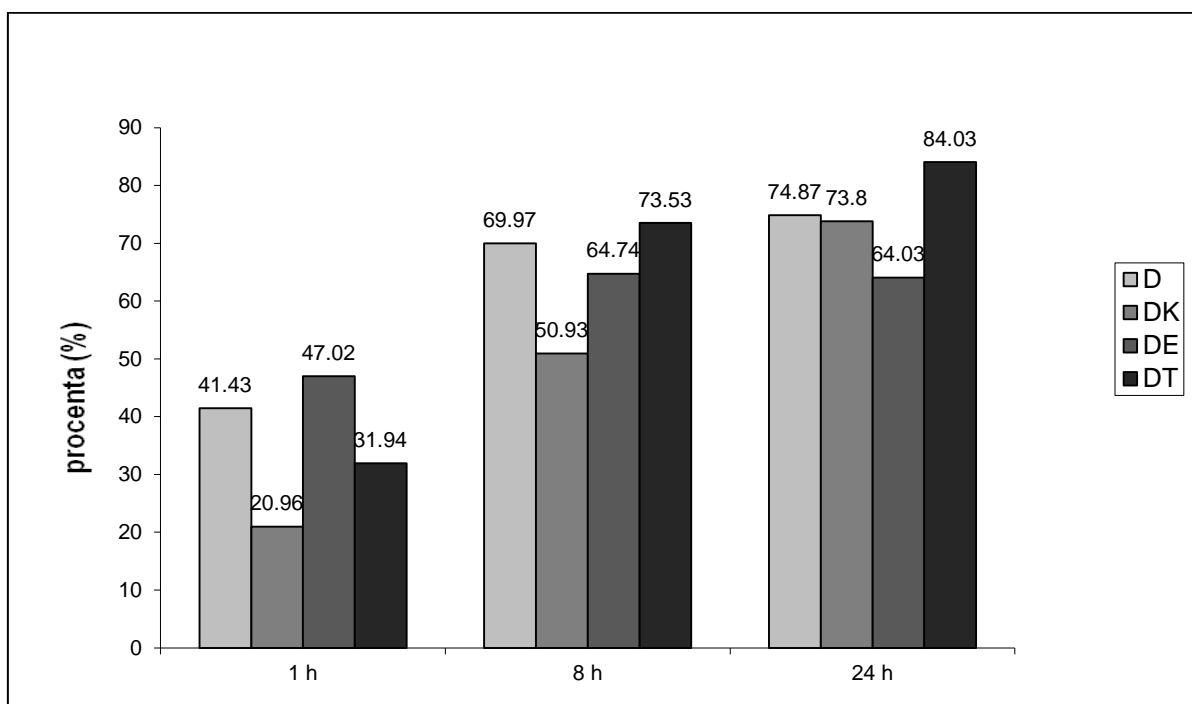
<b>24 h</b>	D	D			
	DE	***	DE		
	DK	***	***	DK	
	DT	***	***	**	DT

\*\* – statisticky signifikantní údaj ( $p < 0,01$ ); \*\*\* – statisticky vysoce signifikantní údaj ( $p < 0,001$ );

D – *L. mucosae* D, kontrola; DK – *L. mucosae* D opracovaný proteinázou K; DE – *L. mucosae* D opracovaný pronázou E; DT – *L. mucosae* D opracovaný trypsinem

### 3.2.4 Míra adhezivita *L. mucosae* D na povrch L929 buněk

Pro porovnání míry adherence *L. mucosae* D opracovaného enzymy na povrch L929 buněk jsme zaznamenané hodnoty vyjádřili procentuálně (Obr. 6). Nejvyšší míru adherence vykazoval *L. mucosae* D po opracování trypsinem po 24 h (84,03 %). Naopak nejmenší míru adherence vykazoval *L. mucosae* D po opracování proteinázou K po 1 h (31,94 %). Samotný *L. mucosae* D nejlépe adheroval po 24 h (74,87 %). *L. mucosae* D opracovaný proteinázou K měl nejvyšší míru adherence po 24 h (73,80 %). Nejvyšší míru adherence po opracování pronázou E měl *L. mucosae* D po 8 h (64,74 %). Po opracování trypsinem měl *L. mucosae* D nejvyšší míru adherence po 24 h (84,03 %).





**Obr. 6:** Procento L929 buněk adherovaných s bakteriálním kmenem, porovnání v jednotlivých časech. D – *L. mucosae* D, kontrola; DK – *L. mucosae* D opracovaný proteinázou K; DE – *L. mucosae* D opracovaný pronázou E; DT – *L. mucosae* D opracovaný trypsinem.

Použitím Studentova t-testu pro porovnání dvou nezávislých hodnot jsme určovali, zda jsou rozdíly mezi *L. mucosae* D opracovaným různými proteolytickými enzymy ve své schopnosti adherovat na povrch L929 buněk statisticky významné nebo nevýznamné.

Porovnávali jsme, zda se statisticky významně lišila míra adhezivita *L. mucosae* D opracovaného třemi proteolytickými enzymy po první hodině. Zjistili jsme, že ve všech případech byla míra adherence navzájem statisticky významně odlišná (Tab. XX).

**Tab. XX:** Statistické porovnání (Studentův t-test pro porovnání rozdílu dvou nezávislých hodnot) míry adherence *L. mucosae* D na povrch buněk L929 opracovaných různými proteolytickými enzymy po 1 h inkubace.

<b>1h</b>	D	D			
	DE	*	DE		
	DK	***	***	DK	
	DT	***	***	***	DT

\* – statisticky signifikantní údaj ( $p < 0,01$ ); \*\*\* – statisticky vysoce signifikantní údaj ( $p < 0,001$ ); D – *L. mucosae* D, kontrola; DK – *L. mucosae* D opracovaný proteinázou K; DE – *L. mucosae* D opracovaný pronázou E; DT – *L. mucosae* D opracovaný trypsinem

Statisticky významný či nevýznamný rozdíl jsme porovnávali i po 8 h inkubace. Zjistili jsme, že mezi mírou adhezivita neopracovaných buněk *L. mucosae* D a *L. mucosae* D opracovaných trypsinem nebyl statisticky signifikantní rozdíl. Ve všech ostatních případech se míra adherence statisticky významně lišila (Tab. XXI).

**Tab. XXI:** Statistické porovnání (Studentův t-test pro porovnání rozdílu dvou nezávislých hodnot) míry adherence *L. mucosae* D na povrch buněk L929 opracovaných různými proteolytickými enzymy po 8 h inkubace.

<b>8 h</b>	D	D			
	DE	*	DE		
	DK	***	***	DK	
	DT	ns	***	***	DT

ns – nesignifikantní rozdíl; \* – statisticky signifikantní údaj ( $p < 0,05$ ); \*\*\* – statisticky vysoce signifikantní údaj ( $p < 0,001$ ); D – *L. mucosae* D, kontrola; DK – *L. mucosae* D opracovaný proteinázou K; DE – *L. mucosae* D opracovaný pronázou E; DT – *L. mucosae* D opracovaný trypsinem

Výsledky získané po 24 h koinkubaci laktobacilů a eukaryotních buněk jsme opět zpracovali pomocí Studentova t-testu pro porovnání dvou nezávislých hodnot. Míra adherence neopracovaných *L. mucosae* D a *L. mucosae* D opracovaných proteinázou K se statisticky významně nelišila. Ve všech ostatních případech byl rozdíl statisticky signifikantní (Tab. XXII).

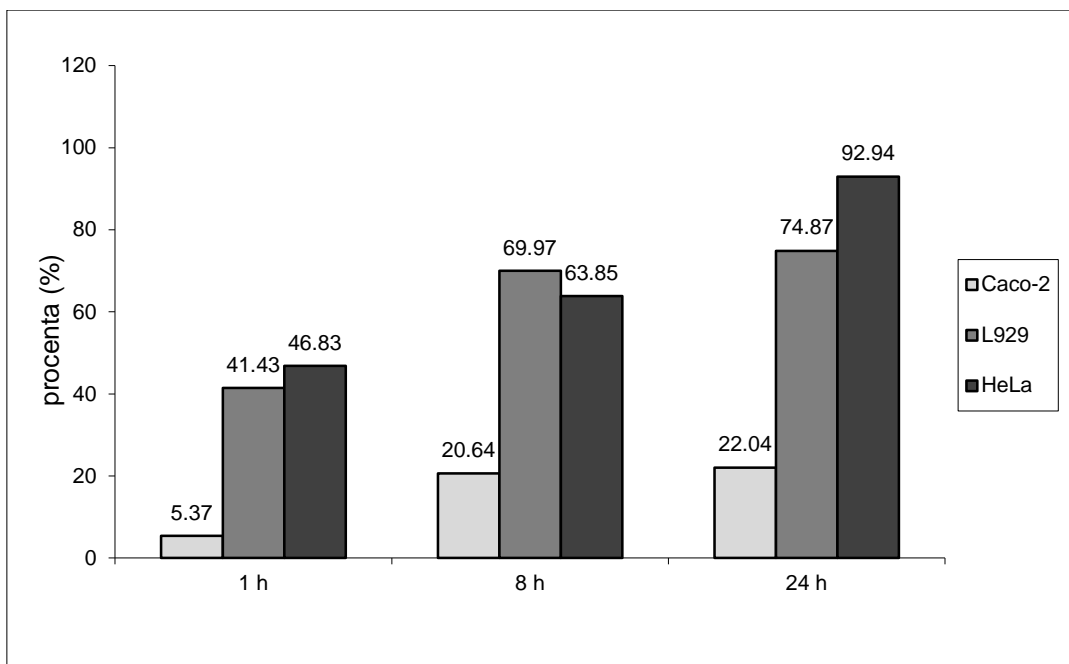
**Tab. XXII:** Statistické porovnání (Studentův t-test pro porovnání rozdílu dvou nezávislých hodnot) míry adherence *L. mucosae* D na povrch buněk L929 opracovaných různými proteolytickými enzymy po 24 h inkubace.

<b>24 h</b>	D	D			
	DE	***	DE		
	DK	ns	***	DK	
	DT	***	***	***	DT

ns – nesignifikantní rozdíl; \*\*\* – statisticky vysoce signifikantní údaj ( $p < 0,001$ ); D – *L. mucosae* D, kontrola; DK – *L. mucosae* D opracovaný proteinázou K; DE – *L. mucosae* D opracovaný pronázou E; DT – *L. mucosae* D opracovaný trypsinem

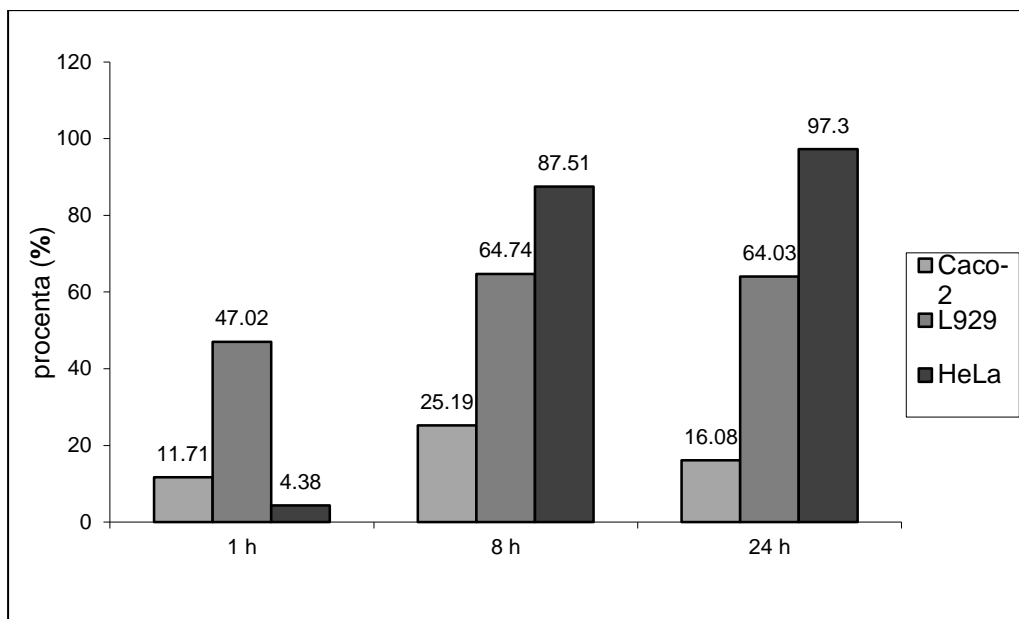
### 3.2.5 Míra adheziviny *L. mucosae* D na povrch HeLa, Caco-2 a L929 buněk – porovnání jednotlivých tkáňových kultur

Na grafu (Obr. 7) můžeme vidět porovnání jednotlivých tkáňových kultur u kontroly, tzn. *L. mucosae* D bez opracování proteolytickými enzymy. Ve všech třech typech tkáňových kultur se míra adheziviny *L. mucosae* D vyvíjela postupně – po první hodině inkubace byla schopnost adherovat na povrch eukaryotických buněk nejnižší, zatímco po 24 h inkubace byla tato schopnost nejvyšší. Nejlépe *L. mucosae* D adheroval na HeLa buňky, a to ve všech hodinách (24 h inkubace 92,94 %). Naopak nejnižší míru adherence jsme zaznamenali Caco-2 buňkách (1 h inkubace 5,37 %).



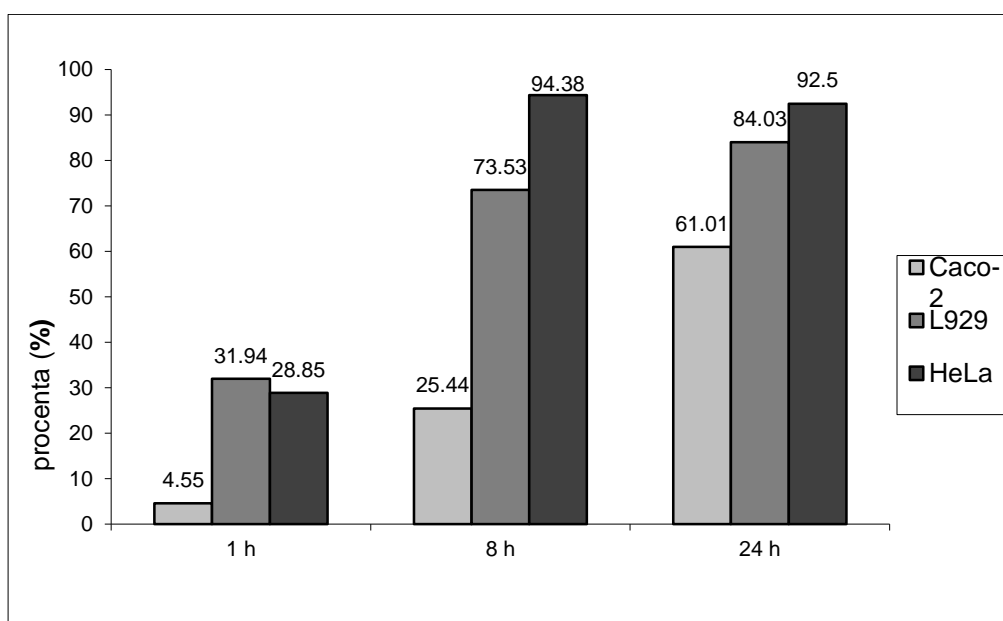
**Obr. 7:** Procento Caco-2, L929 a HeLa buněk adherovaných s *L. mucosae* D, porovnání jednotlivých buněčných linií.

Na dalším grafu je zaznamenáno porovnání míry adherence *L. mucosae* D opracovaného pronázou E. Stejně jako v případě kontroly, nejlépe *L. mucosae* D adheroval na HeLa buňky, a to po 24 h inkubace (97,3 %). Nejmenší schopnost adherovat vykazoval *L. mucosae* D po 1 h inkubace, taktéž u HeLa buněk (4,38 %). Oproti kontrole se míra adhezivity nezvyšovala postupně v čase. V případě Caco-2 i L929 buněk byla nejvyšší míra adherence zaznamenána po 8 h inkubace. Pouze u HeLa buněk byla prokázána postupně se zvyšující míra adherence v čase (Obr. 8).



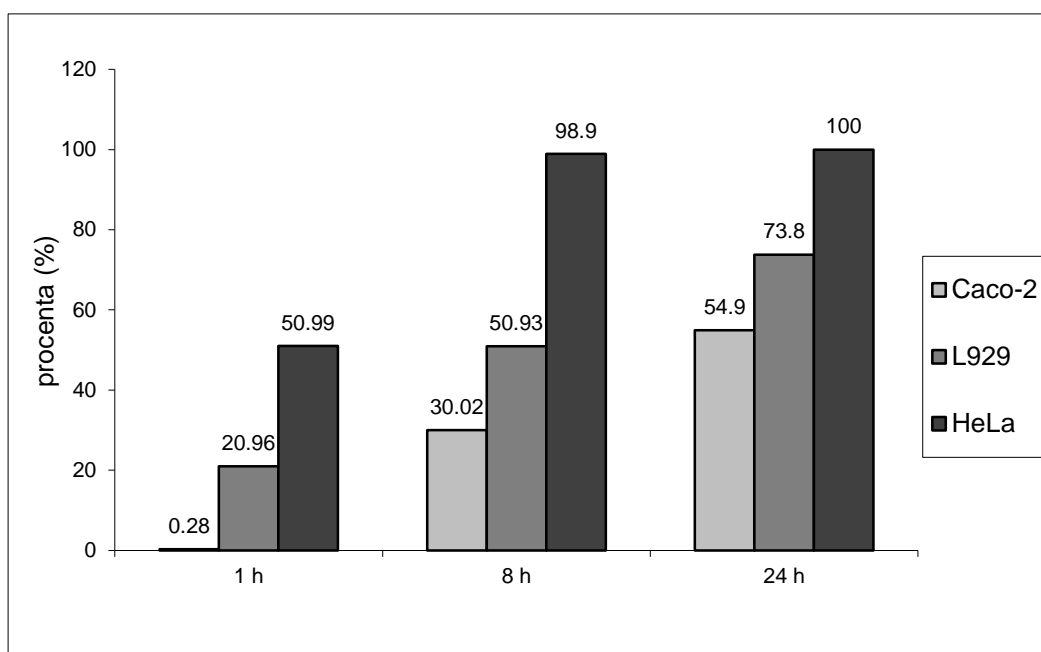
**Obr. 8:** Procento Caco-2, L929 a HeLa buněk adherovaných s *L. mucosae* D opracovaným pronázou E, porovnání jednotlivých buněčných linií.

Porovnání jednotlivých tkáňových kultur, v případě *L. mucosae* D opracovaného trypsinem, zaznamenává následující graf (Obr. 9). Stejně jako v předchozích dvou případech, i tady *L. mucosae* D nejlépe adheroval na HeLa buňky, ale tentokrát po 8 h inkubace (94,38 %). Podobně jako u kontroly, nejhůře *L. mucosae* D adheroval na Caco-2 buňky (inkubace 1 h, 4,55 %). *L. mucosae* D vykazoval postupný nárůst schopnosti adherence u Caco-2 buněk a L929 buněk.



**Obr. 9:** Procento Caco-2, L929 a HeLa buněk adherovaných s *L. mucosae* D opracovaným trypsinem, porovnání jednotlivých buněčných linií.

V posledním grafu je opět znázorněné porovnání jednotlivých tkáňových kultur, tentokrát s *L. mucosae* D opracovaným proteinázou K. Stejně jako ve všech třech předchozích případech měl *L. mucosae* D nejvyšší míru adherence u HeLa buněk po 24 h inkubace (100 %). Nejnižší míra adherence byla prokázána taktéž v případě HeLa buněk, a to po 1 h inkubace (0,28 %). V tomto případě je zajímavé, že už po 8h inkubace byla schopnost *L. mucosae* D adherovat na HeLa buňky téměř 100 % (98,9 %). Míra adherence se, stejně jako v případě kontroly, vyvíjela postupně v čase (Obr. 10).



**Obr. 10:** Procento Caco-2, L929 a HeLa buněk adherovaných s *L. mucosae* D opracovaným proteinázou K, porovnání jednotlivých buněčných linií.

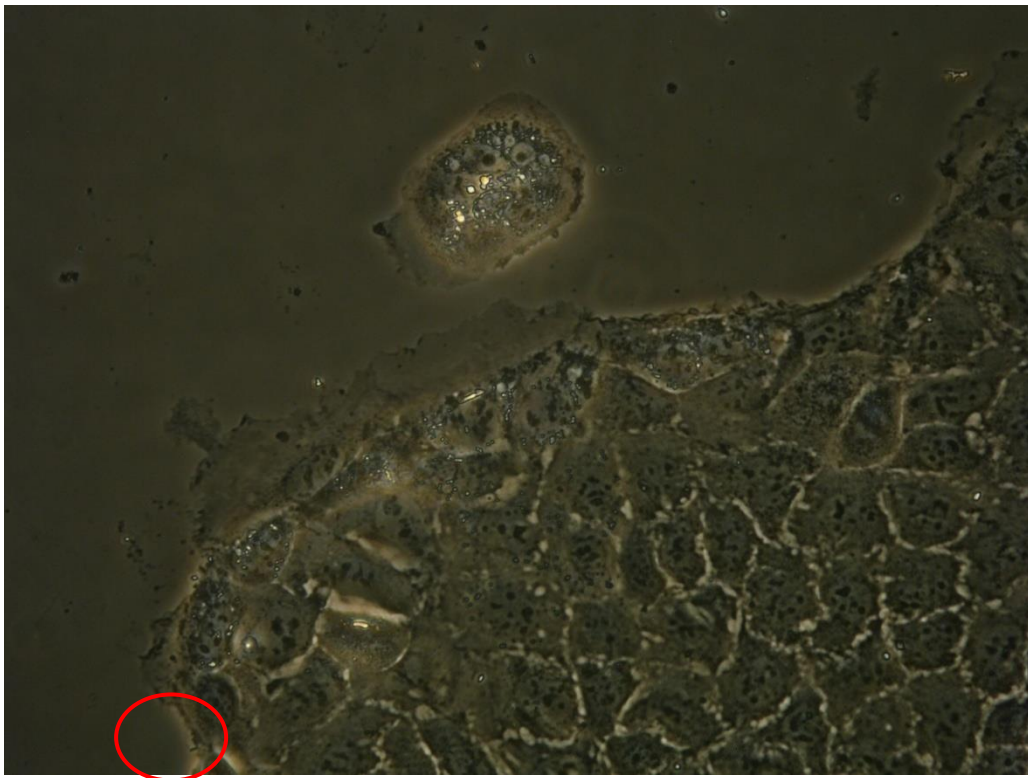
### 3.3 Mikrokinematografické zobrazení vazby mezi prokaryotní a eukaryotní buňkou

Na ilustraci vzniku, trvání a zániku vazby mezi prokaryotní a eukaryotní buňkou jsme použili mikrokinematografické zobrazení této vazby. K tomuto účelu byly použity bakteriální kmeny *L. mucosae* D a *S. aureus*, jako zástupce eukaryot Caco-2 buňky.

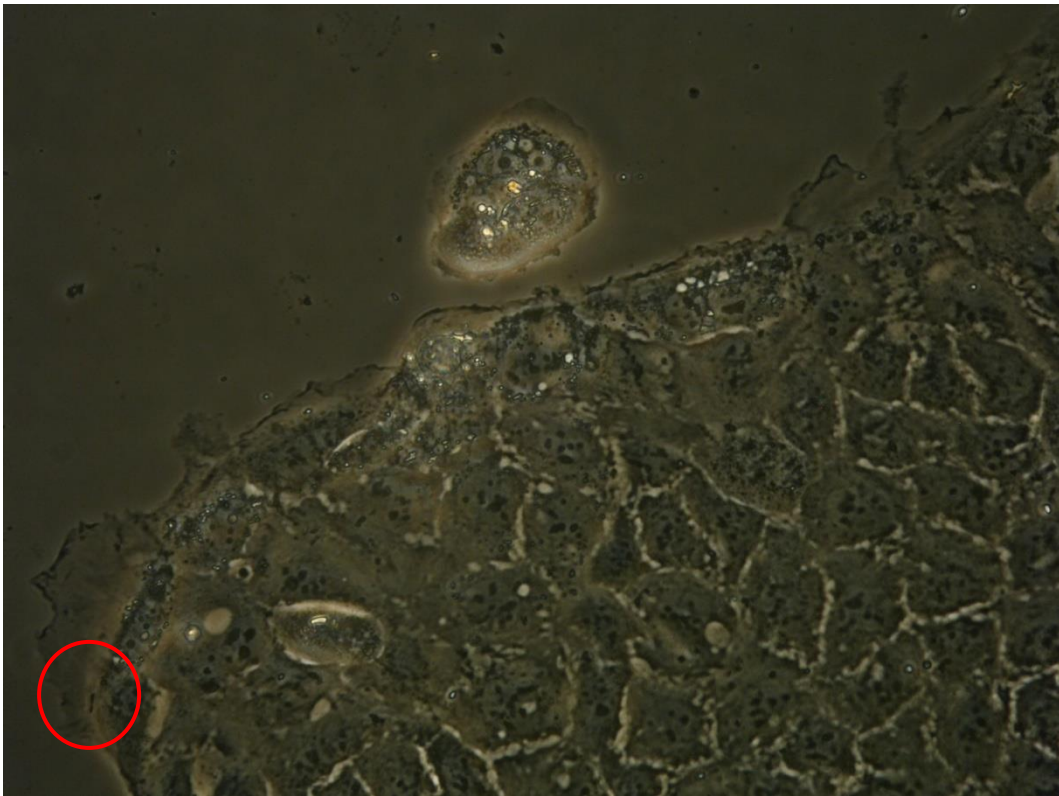
Jako příklad uvádíme tři záznamy různých sběrných časů. Vznik vazby mezi bakteriálními buňkami *L. mucosae* D a povrchem Caco-2 buňky se začal vyvíjet přibližně po 2 h 45 min koinkubace (Obr. 11). Vazba mezi bakteriální buňkou *L. mucosae* D a Caco-2 buňkou byla zachycena o 3 h 30 min (Obr. 12) a po 6 h (Obr. 13) koinkubace.



**Obr. 11:** Vznik vazby mezi *L. mucosae* D a Caco-2 buňkou po 2 h 45 min koinkubacie. (Zvětšení mikroskopu 400x).



**Obr. 12:** Vazba bakteriálních buněk *L. mucosae* D na Caco-2 buňku po 3 h 30 min h koinkubace. (Zvětšení mikroskopu 400x).



**Obr. 13:** Vazba bakteriálních buněk *L. mucosae* D na Caco-2 buňku po 6 h koinkubace. (Zvětšení mikroskopu 400x).

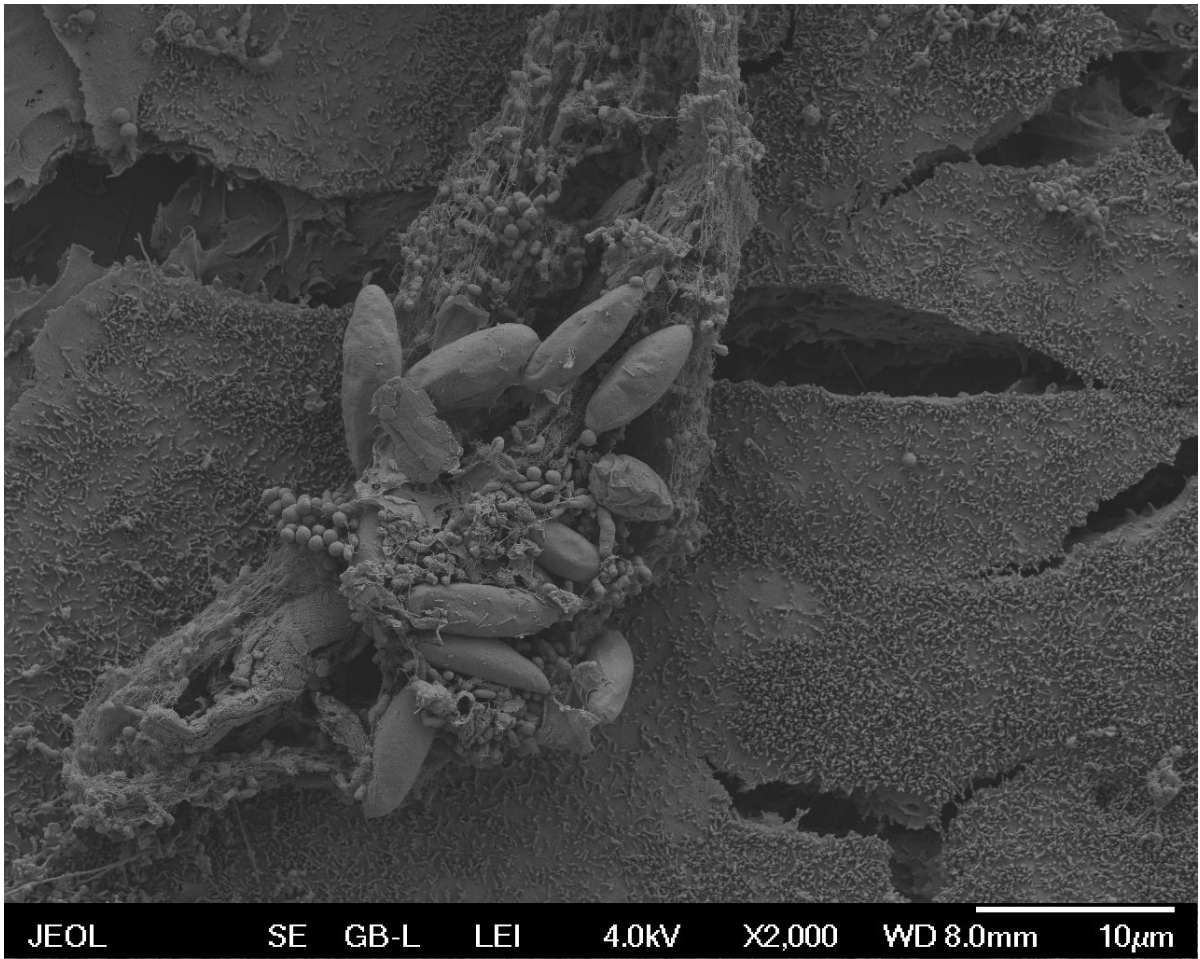
### **3.4 Studium vztahu eukaryotních a prokaryotních buněk a jejich vzájemné vazby a morfologie**

Pomocí skenovací elektronové mikroskopie s pulzním polem (FESEM) jsme studovali morfologii Caco-2 buněk, bakteriálních buněk a jejich vzájemnou interakci. Použity byly oba testované bakteriální kmeny (*L. mucosae* D a *S. aureus*), které byly inkubovány spolu s Caco-2 buňkami po dobu 2 h (Obr. 14).

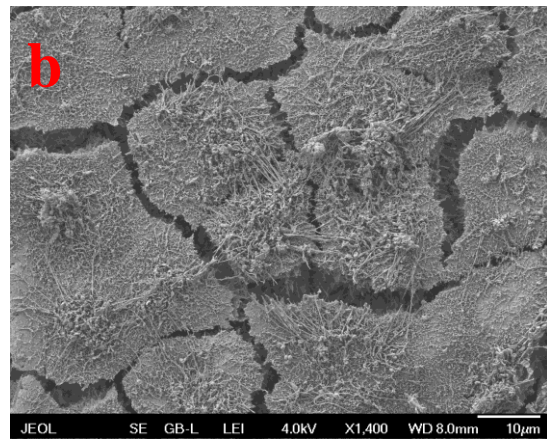
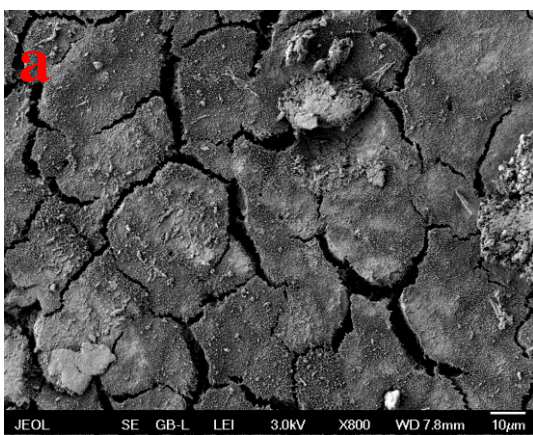
Caco-2 buňky, které byly kultivované v MEM médiu samostatně bez laktobacilů či stafylokoků (Obr. 15a), byly morfologicky rozdílné od Caco-2 buněk kokultivovaných s bakteriemi (Obr. 15b). Caco-2 buňky kultivované samostatně měly méně cytoplazmatických výběžků, oproti Caco-2 buňkám kokultivovaným s *L. mucosae* D a *S. aureus*. Tyto výběžky vytvářely obrovskou síť, jejíž pomocí buňky komunikují (Obr. 16) a tato síť částečně pokrývala povrchy buněk.

Bakteriální kmeny mohou adherovat na různé části povrchu Caco-2 buňky, např. na cytoplazmatické výběžky (Obr. 17).



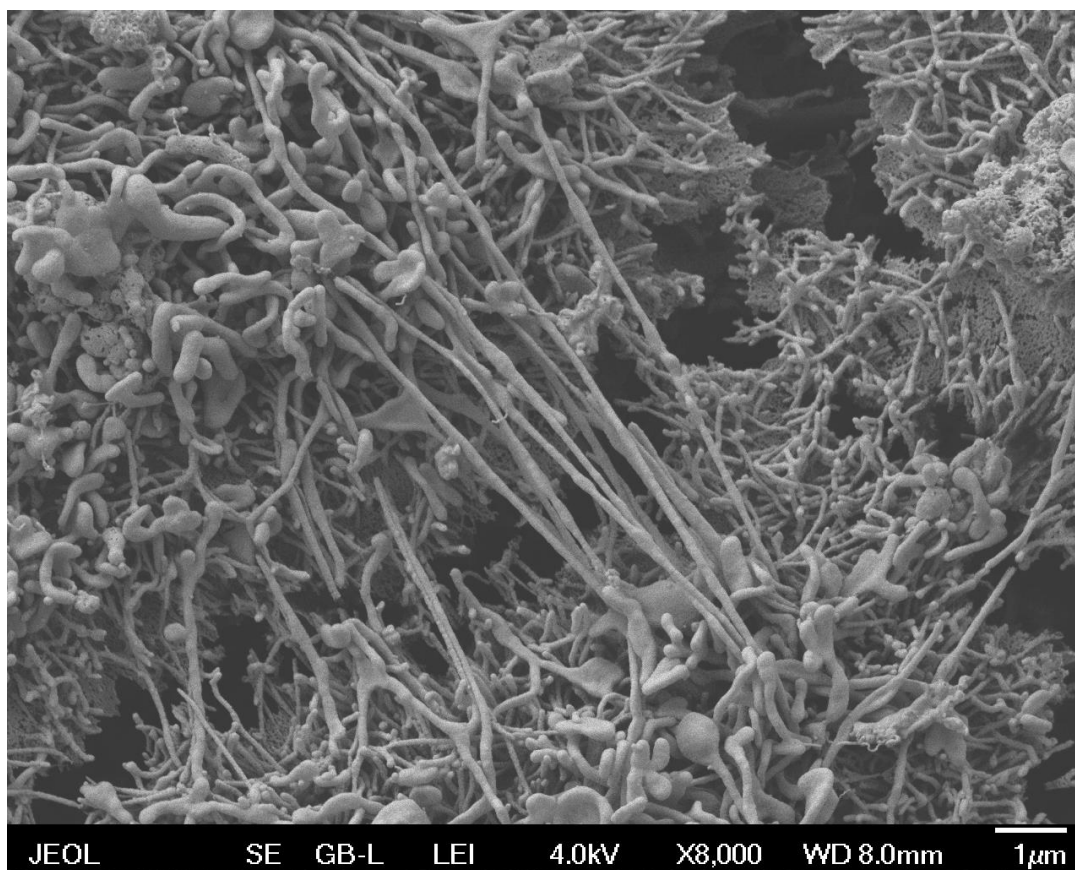


Obr. 14: Caco-2 buňky kokultivované s *L. mucosae* D a *S. aureus*.

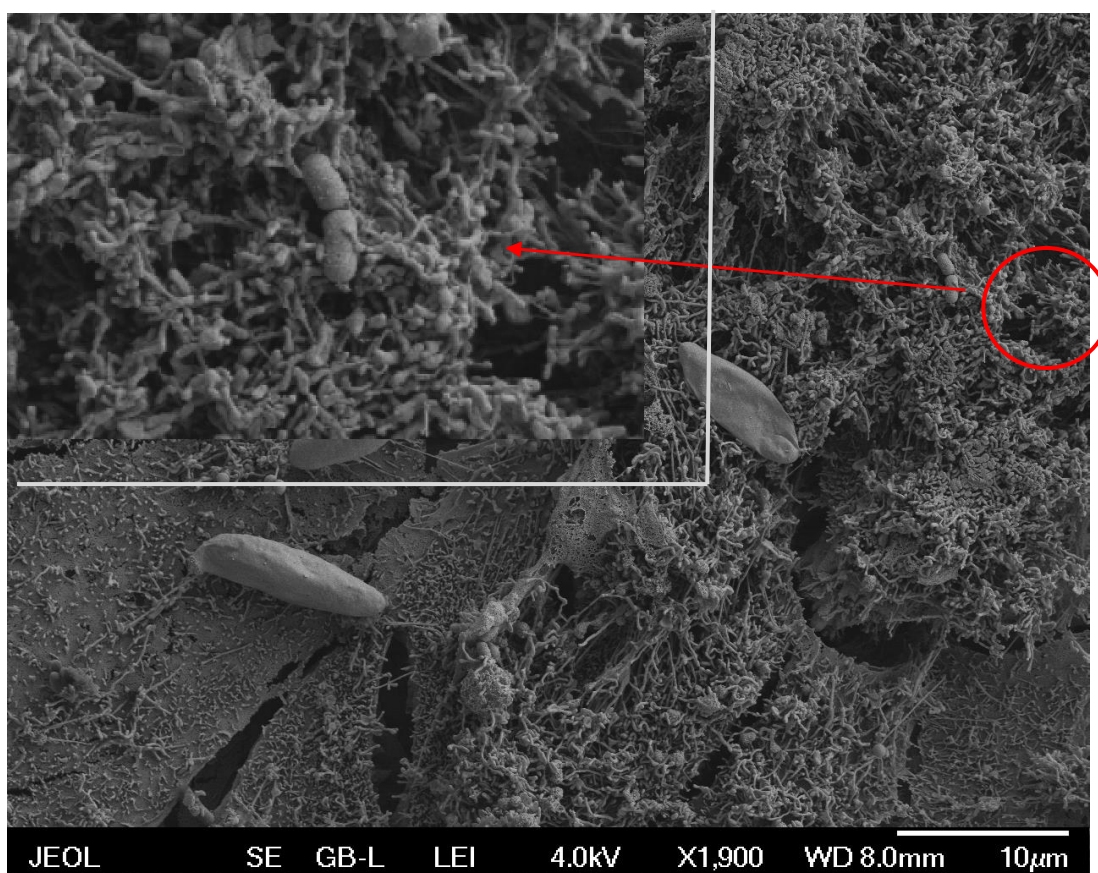


Obr. 15: **a** – Caco-2 buňky; **b** – Caco-2 buňky kokultivované s *L. mucosae* D a *S. aureus*.





**Obr. 16:** Detail komunikace mezi buňkami prostřednictvím cytoplazmatických výběžků.



**Obr.17:** Přichycení *L. mucosae* D na cytoplazmatické výběžky Caco-2 buňky.

## 4 Diskuze

K našim experimentům jsme jako testovací mikroorganismus vybrali *L. mucosae* D, protože zástupci rodu *Lactobacillus* kromě toho, žepatří k nejpočetnější skupině bakterií mléčného kvašení, bývají často využívány v probiotických preparátech. Taktéž předcházející testy naznačují možné použití tohoto kmene v probiotikách pro lidi nebo zvířata. Jedná se o nesporulující, G<sup>+</sup> tyčky, které se nacházejí nejen v ústní dutině a GIT, ale i v ženském urogenitálním traktu jako součást fyziologické mikroflóry.

Cílem předkládané práce bylo testování bakteriálního kmene *L. mucosae* D v jeho schopnosti adherovat na vybrané živočišné buněčné linie za různých podmínek. V první řadě jsme testovali jeho schopnost konkurovat v adherenci indikačnímu kmenu *Staphylococcus aureus* CCM 4516 ve třech různých obměnách experimentu. Za tímto účelem jsme vybrali buněčnou linii Caco-2. Dále jsme sledovali, jaký vliv mělo odstranění povrchových proteinů laktobacila nespecifickými proteázami na samotnou adherenci. V tomto případě jsme použili buněčné linie Caco-2, HeLa a L929. Pomocí mikrokinematografického zobrazení vazby bakterií na povrch eukaryotních buněk jsme sledovali vznik, trvání a zánik této vazby. Použitím FESEM jsme pozorovali morfologii samotné vazby prokaryotní a eukaryotní buňky a jejich interkaci.

Jak je uváděno v literatuře, probiotické vlastnosti mikroorganismů jsou kmenově specifické. U mikroorganismů, které mají být používány jako probiotika, musí být podle FAO/WHO provedena genová typizace a kromě jiného musí být testovány na schopnost adherovat na povrchy buněčných linií (2001). Podle Ouwehanda jsou probiotika určena několika různými faktory a proto je musí potenciálně probiotický kmen splňovat, např. musí být lidského původu, musí být bezpečný, musí přežít kyselé prostředí žaludku a musí vykazovat pozitivní účinky na zdraví (2002). V naší práci byl použit kmen *L. mucosae* D coby zástupce prokaryotních buněk a zároveň zástupce potenciálně probiotické bakterie. Testování tohoto kmene již v několika uplynulých letech probíhá na Katedře buňkové a molekulární biologie léčiv na Farmaceutické fakultě UK v Bratislavě. Ve více ohledech se tenhle kmen jeví jako potenciální probiotikum, což byl jeden z důvodů, proč jsme ho zahrnulido našich experimentů.

Hlavním parametrem ovlivňujícím interakci laktobacilů s hostitelským makroorganismem je adhezivita. Umožňuje totiž dočasnou kolonizaci střeva nebo třeba konkurenční vytěsnění patogenů (Bezkorovainy, 2001). V našem experimentu jsme použili pro odstranění povrchových proteinů laktobacila tři nespecifické proteolytické enzymy

(pronáza E, proteináza K a trypsin), abychom zjistili, zda dojde k významnému ovlivnění adhezivity laktobacilů na eukaryotické buňky. Jednou z nejdůležitějších struktur, ovlivňující míru adherence, jsou povrchové proteiny mikroorganismů, např. proteiny povrchové vrstvy (tzv. „S-layer“), nezakotvené housekeeping proteiny, transportní proteiny, atd. Adhezivita je samozřejmě ovlivňována velkou spoustou dalších faktorů, mezi které patří růstové médium (Ouwehand a kol., 2001), přítomnost jiných probiotických kmenů (Larsen a kol., 2007), enzymy trávicího systému (Ouwehand a kol., 2001), nízké pH (Riedel a kol., 2006) nebo přítomnost žluči (Gueimonde a kol., 2005).

Úkolem mé diplomové práce bylo zjistit, jakým způsobem se ovlivňují *L. mucosae* D a *S. aureus* v testech vytěsňování, vylučování a soutěžení. Cílem bylo zjistit, zda je potenciálně probiotická bakterie *L. mucosae* D schopná vytěsňovat indikační kmen *S. aureus* z vazby na střevní buňky.

Adhezivita je samozřejmě důležitá i pro patogenní bakterie. Pro ty je ovšem adhezivita zároveň kritickým bodem, jelikož umožňuje uvolnění enzymů a toxinů, které vyvolávají nekrotický proces přímo v cílové buňce, čímž usnadňují invazi (Jankowska a kol., 2008). Některé studie naznačují, že právě bakterie mléčného kvašení mohou potenciálně infekci zabránit, a to konkurenčním vyloučením; to znamená, že zabrání vazbě patogenů a tím i kolonizaci střeva (Zárate & Nader-Macias, 2006) – viz diskuze níže. Laktobacily působí na patogeny produkcí antimikrobiálních sloučenin, jako jsou organické kyseliny, zejména pak kyselina mléčná peroxid vodíku, bakteriociny, nebo jiné specifické látky, např. reuterin a reutericyklin (Mc-Groarty & Reid, 1988). Tyto *in vitro* studie by měly prokázat očekávané chování probiotik a měly by být vhodným krokem před přistoupením ke studiím *in vivo*, které jsou obecně obtížné. Nám se v našem experimentu tuto teorii nepodařilo potvrdit. Ve všech třech testech (tzn. test vytěsnění, test vyloučení a test soutěžení) jsme vyšší míru adherence pozorovali u *S. aureus*, bez ohledu na to, zda byl přidán jako první, jako druhý nebo současně s *L. mucosae* D. Pro porovnání míry adherence jednotlivých bakteriálních kmenů na povrch Caco-2 buněk jsme provedli kultivaci Caco-2 buněk též s čistou kulturou *L. mucosae* D a s čistou kulturou *S. aureus*. Hodnocení probíhalo po 2 a 4 h kultivace. Oba kmeny měly vyšší míru adherence po delší době kokultivace (4 h), *S. aureus* (74,16 %), *L. mucosae* D (34,63 %). *S. aureus* adheroval lépe než *L. mucosae* D ve všech modifikacích experimentu, a to vždy minimálně o 20%.

K *in vitro* studiím se běžně využívají různé střevní buněčné linie. V naší práci byla použita střevní buněčná linie Caco-2 (Coconnier a kol., 2000), což jsou epitelové buňky kolorektálního karcinomu. Caco-2 buňky se ke zjišťování adherence mikroorganismů na

povrch eukaryotických buněk využívají nejčastěji (Lee a kol., 2003). Využili jsme také HeLa buňky, neboť stejně jako Caco-2 buňky jsou využívány pro hodnocení míry adhezivní bakterii mléčného kvašení (Atassi a kol., 2006) a zároveň jsou nejstudovanějším modelem lidských buněk. V neposlední řadě jsme chtěli ověřit, zda i původ (jiný živočišný druh) buněk má vliv na míru adhezivní mikroorganismů na povrch eukaryotických buněk. Ze stejného důvodu byly v experimentu použity také L929 buňky.

Abychom zjistili, jak významně se na adhezivní *L. mucosae* D podílejí proteiny, upravovali jsme laktobacily třemi proteolytickými enzymy (pronáza E, proteináza K, trypsin). Míra adhezivní *L. mucosae* D upravovaného pronázou E, proteinázou K a trypsinem (prokaryotní organismus) k HeLa, Caco-2 a L929 buňkám (eukaryotní buňky) byla hodnocena po 1, 8 a 24 h inkubace pomocí optické mikroskopie a byla vyhodnocována statisticky. Pro porovnání jsme inkubaci provedli též s neupravenými bakteriálními buňkami.

V téměř všech případech se prokázalo, že 1 h je příliš krátká doba na obnovu povrchových struktur, i když v případě laktobacilů upravovaných pronázou E jsme zaznamenali signifikantně vyšší míru adhezivní oproti neupraveným buňkám. To naznačuje, že laktobacily byly schopné obnovit své povrchové proteinové struktury zodpovědné za vazbu za dobu kratší než je jedna hodina. Tento trend jsme pozorovali jak u Caco-2 buněk, tak u buněk linie L929. Při testování na buněčné linii HeLa jsme podobný výsledek zaznamenali u laktobacilů upravovaných enzymem proteináza K. Výsledky po 8 h a 24 h byly téměř srovnatelné, ale v převážné většině jsme nejvyšší míru adhezivní pozorovali po 24 h inkubace.

Překvapivé bylo také to, že co se buněčné linie týče, nejnižší hodnoty míry adhezivní jsme získali u linie Caco-2, což jsou buňky původem izolované ze střeva, které je významným místem působení probiotických organismů. Co se dělá buněčných linií, nejvyšší míru adhezivní jsme pozorovali u linie HeLa, která se nám osvědčila i v předchozích experimentech (Florová, 2010). Do budoucna by bylo vhodné pro podobné experimenty použít nikoli buňky rakovinného původu, ale buňky ze zdravé střevní lidské sliznice. Buňky střevní sliznice mají oproti ostatním buňkám jednu nevýhodu, a to obtížnější kultivaci. (Březina a kol., nepublikované výsledky).

Více markerů a typické charakteristiky fyziologických buněk klu tenkého střeva vykazují Caco-2 buňky. Caco-2 jsou buňky heteronukleárně epiteloidní, izolované z adenokarcinomu střeva (Fogh a kol., 1977; Pinto a kol., 1983). Jiným vhodným modelem ke studiu bakteriální adhezivní jsou HeLa buňky, izolované z karcinomu děložního čípku

(Maggi a kol., 2000; Attasi a kol., 2006). Z druhé strany, poznatky získané v *in vitro* experimentech ne vždy korelují s výsledky *in vivo* experimentů (Lahtinen a Ouwehand, 2009).

V budoucnosti by jistě bylo vhodné zaměřit se na specifické odstranění struktur právě zodpovědných za adhezenci, jelikož jsme v naší práci dokázali, že k ovlivnění adhezivity opravdu dochází. K opracování povrchových proteinů se využívá také LiCl (Wang a kol., 2007).

Pro znázornění vzniku, trvání a zániku vazby mezi prokaryotní a eukaryotní buňkou jsme použili mikrokinematografické zobrazení této vazby. K tomuto účelu byly použity bakteriální kmeny *L. mucosae* D a *S. aureus*, jako zástupce eukaryot Caco-2 buňky. Během koinkubace, trvající 24 h, se nám podařilo zaznamenat vznik a trvání vazby mezi *L. mucosae* D a Caco-2 buňkou. V našem experimentu se vazba začala vyvíjet někdy během třetí hodiny koinkubace. Tento výsledek byl pro nás důležitý, jelikož se tímto experimentem potvrdilo, že vznik vazby je časově závislý.

Morfologii Caco-2 buněk, bakteriálních kmenů a jejich vzájemnou interakci jsme sledovali pomocí skenovací elektronové mikroskopie s pulzním polem (FESEM). Použity byly obě testované bakteriální kultury (*L. mucosae* D a *S. aureus*), které byly inkubovány spolu s Caco-2 buňkami po dobu 2 h. Caco-2 buňky, které byly kultivované v MEM médiu samostatně bez laktobacilů či stafylokoků, byly morfologicky rozdílné od Caco-2 buněk kokultivovaných s vybranými bakteriálními kmeny. Caco-2 buňky kultivované samostatně téměř neměly cytoplazmatické výběžky, jejich okraje byly ostřejší, méně „roztřepené“ a jejich povrch byl více zvrásněn. Naproti tomu Caco-2 buňky kokultivované s *L. mucosae* D a *S. aureus* vytvářely obrovskou síť, tvořenou dlouhými, tenkými cytoplazmatickými výběžky. Pomocí těchto výběžků mezi sebou buňky komunikují, takže slouží jako mezibuněčné komunikační kanály. Tato síť také částečně pokrývá povrch Caco-2 buněk, který je hladší, než tomu bylo u Caco-2 buněk kultivovaných samostatně (viz. diskuze níže). Ve studii Klayraunga a Okonogie (2009) bylo pomocí SEM zjišťováno, zda má antibakteriální aktivita kmene *L. fermentum* vliv na změnu morfologie buněk několika patogenních bakteriálních kmenů (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* ser. *typhi*, *Shigella sonnei* a *Staphylococcus aureus*), se kterými byly kokultivované. Antibakteriální aktivita laktobacilů způsobila poškození buněčné membrány patogenních bakterií, což mělo za následek smršťování či popraskání buněk daného patogena. V našem případě jsme sledovali morfologickou změnu eukaryotických Caco-2 buněk, která se projevila větším množstvím cytoplazmatických výběžků. Toto pozorování se shoduje s našimi předchozími výsledky

(Florová, 2010). Testování se provádělo na HeLa buňkách a byl použit kmen *L. plantarum* CCDM 92. Výsledkem byla, stejně jako v této práci, nadměrná produkce cytoplazmatických výběžků, které propojují jednotlivé buňky. Proto můžeme předpokládat, že právě přítomnost bakterií způsobuje vznik vyššího množství mezibuněčných komunikačních kanálů. Též předpokládáme, že přítomnost bakterií, zejména laktobacila, který produkuje organické kyseliny fermentací sacharidů, je formou stresu pro zmíněné eukaryotní buňky. Právě ony jsou citlivé na pH kultivačního prostředí, které laktobacily okyselují. Naše předpoklady vychází z hypotézy, že změnu morfologie HeLa i Caco-2 buněk způsobuje snížení pH různými kyselinami (kyselina mléčná, kyselina octová, atd.) produkovanými bakteriemi mléčného kvašení, ale také i jiné jejich produkty, např. peroxid vodíku (Moy a kol., 2004).

Na základě našich i předchozích výsledků (Bilková a kol., 2008) předpokládáme, že testovaný kmen *L. mucosae* D vykazuje vlastnosti probiotického kmene. Nicméně další, testy, zejména *in vivo*, je nutné provést.

## 5 Závěry

- 1) Vliv *Lactobacillus mucosae* D na adhezenci *Staphylococcus aureus* na povrch eukaryotní buňky:
  - a) Zjistili jsme, že největší schopnost *L. mucosae* D konkurovat *S. aureus* byl v případě testu vyloučení.
  - b) *S. aureus* měl největší míru adherence na Caco-2 v případě testu soutěžení (57,29 %), nejmenší naopak u testu vyloučení (38,70 %).
  - c) *L. mucosae* D měl největší schopnost adherovat na Caco-2 buňky v případě testu vyloučení (18,60 %), nejmenší u testu vytěsnění (10,90 %).
  - d) Při samostatné kultivaci měl jak kmen *S. aureus* (74,16 %), tak kmen *L. mucosae* D (34,63 %) vyšší míru adherence po 4 h kultivace.
  - e) Statisticky významný rozdíl ve schopnosti adherovat na povrch Caco-2 buněk byl pozorován mezi kmeny *L. mucosae* D a *S. aureus* ve všech třech testech.
  - f) *S. aureus* adheroval lépe než *L. mucosae* D ve všech modifikacích experimentu, a to vždy minimálně o 20%.
- 2) Úloha povrchových proteinů laktobacilů v adhezenci na povrch eukaryotních buněk:
  - a) Zjistili jsme, že míra adherence *L. mucosae* D na povrch třech různých buněčných linií byla časově závislá.
  - b) Odstranění povrchových proteinových struktur mělo aktivační účinek na jejich další expresi – míra adherence se v čase zvyšovala a byla signifikantně vyšší než u buněk *L. mucosae* D nepracovaných proteázou.
  - c) U buněčné linie Caco-2 pocházející ze střeva jsme pozorovali nejnižší míru adherence *L. mucosae* D. Naopak nejvyšší míra adherence byla zaznamenána u buněčné linie HeLa.

- d) Z našich výsledků usuzujeme, že opracování povrchu bakteriálních buněk mělo vliv na následné zvýšení exprese povrchových proteinů zodpovědných za adherenci, v porovnání s buňkami *L. mucosae* D neopracovanými enzymy.
  - e) V případě Caco-2 buněk měl nejlepší schopnost obnovit své povrchové proteiny *L. mucosae* D při opracování trypsinem po 24 h kultivace (61,01 %). Naopak nejnižší míru adherence ke Caco-2 buňkám vykazoval *L. mucosae* D po opracování proteinázou K po 1 h kultivace (0,28 %).
  - f) UHeLa buněk byla míra adherence nejvyšší při opracování proteinázou K po 24 h (100,00 %) a nejnižší po opracování proteinázou E po 1 h (4,38 %)
  - g) V případě L929 buněk byla stejně jako u Caco-2 a HeLa buněk nejvyšší míra adherence po 24 h při opracování trypsinem (84,03 %), nejnižší po opracování proteinázou K po 1 h (20,96 %).
- 3) Mikrokinematografickým zobrazením vazby mezi prokaryotickou (*L. mucosae* D a *S. aureus*) a eukaryotickou (Caco-2 buňky) buňkou byl pozorován vznik, trvání a zánik této vazby po čas 24 h. Tato vazba je zřejmě časově závislá.
- 4) Studium vztahu eukaryotních a prokaryotních buněk a jejich vzájemné vazby a morfologie pomocí FESEM:
- a) Pomocí skenovací elektronové mikroskopie v pulzním poli byla pozorována morfologie a vztah mezi prokaryotickou (*L. mucosae* D a *S. aureus*.) a eukaryotickou (Caco-2 buňky) buňkou.
  - b) Byl pozorován morfologický rozdíl mezi Caco-2 buňkami kultivovanými samostatně a mezi Caco-2 buňkami kokultivovanými s bakteriálními kmeny.



## 6 Literatura

**Antikainen, J., Korhonen, T.K., Kuparinen, V., Toba, T., Roos, S. (2009):** *Surface proteins of Lactobacillus involved in host interactions.* In: Ljungh, Å. (ed.). *Lactobacillus Molecular Biology: From Genomics to Probiotics.* Caister Academic Press, Norfolk, s. 95–114.

**Antikainen, J., Kuparinen, V., Lähtenmäki, K., Korhonen, T.K. (2007b):** *Enolases from Gram-positive bacterial pathogens and commensal lactobacilli share functional similarity in virulence-associated traits.* FEMS Immunol. Med. Microbiol., 51, s. 526–534.

**Aso, Y., Akaza, H., Kotake, T., Tsukamoto, T., Imai, K., Naito, S., BLP Study Group (1995):** *Preventive effect of a Lactobacillus casei preparation on the recurrence of superficial bladder cancer in a double-blind trial.* Eur. J. Urol., 27, s. 104–109.

**Atassi, F., Brassart, D., Grob, P., Graf, F., Servin, A.L. (2006):** *In vitro antibacterial activity of Lactobacillus helveticus strain KS300 against diarrhoeagenic, uropathogenic and vaginosis-associated bacteria.* J. Appl. Microbiol., 101, s. 647–654.

**ATCC:** <http://www.cicams.ac.cn/marker/cell%20lines/L929.htm> (28.11. 2012).

**Baccigalupi, L., Di Donato, A., Parlato, M., a kol. (2005):** *Small surface-associated factors mediate adhesion of a food-isolated strain of Lactobacillus fermentum to Caco-2 cells.* Res. Microbiol., 156, s. 830–836.

**Bergonzelli, G.E., Granato, D., Pridmore, R.D., Marvin-Guy, L.F., Donnicola, D., Corthésy-Theulaz, I.E. (2006):** *GroEL of Lactobacillus johnsonii La1 (NCC 533) is cell surface associated: potential role in interactions with the host and the gastrin pathogen Helicobacter pylori.* Infect. Immun., 74, s. 425–434.

**Bernet, M.F., Brassart, D., Neeser, J.R., Servin, A.L. (1993):** *Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions.* Appl. Environ. Microbiol., 59, s. 4121–4128.

**Bernet, M.F., Brassart, D., Neeser, J.R., Servin, A.L. (1994):***Lactobacillus acidophilus LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria.* Gut, 35, s. 483–489.

**Bezkorovainy, A. (2001):** *Probiotics: determinants of survival and growth in the gut.* Am. J. Clin. Nutr., 73, s. 399–405.

**Bilková, A., Kiňová Sepová, H., Bilka, F., Bukovský, M., Balažová, A., Bezáková, L. (2008):** *Identification of newly isolated Lactobacilli from the stomach mucus of lamb,* Acta Facult. Pharm. Univ. Comenianae, 55, s. 64–72.

**Black, F.T., Andersen, P.L., Örsskov, J., Örskov, F., Gaarslev, K., Laulund, S. (1989):***Prophylactic efficacy of lactobacilli on travelers diarrhea.* Travel Med., 7, s. 333–335.

**Black, F., Einarsson, K., Lidbeck, A., Orrhage, K., Nord, C.E. (1991):** *Effect of lactic acid producing bacteria on the human intestinal microflora during ampicillin treatment.* Scand. J. Infect. Dis, 2, s. 247–254.

**Blum, S., Reniero, R., Schiffrin, E.J., Crittenden, R., Mattila-Sandholm, T., von Wright, A., Saarela, M., Saxelin, M., Collins, K., Morelli, L. (1999):***Adhesion studies for probiotics: need for validation and refinement.* Trends Food Sci. Tech., 10, s. 405–410.

**Brigidi, P., Vitali, B., Swennen, E., Bazzocchi, G., Matteuzzi, D. (2001):***Effects of probiotic administration upon the composition and enzymatic activity of human fecal microbiota in patients with irritable bowel syndrome or functional diarrhea.* Res. Microbiol., 152, s. 735–741.

**Buck, B.L., Altermann, E., Svingerud, T., Klaenhammer, T.R. (2005):** *Functional analysis of stative adhesion factors in Lactobacillus acidophilus NCFM.* Appl. Environ. Microbiol, 71, s. 8344–8351.

**Bukowska, H., Piezul-Mróż, J., Jastrzebska, M., Chelstowski, K. And Naruszewicz, M. (1998):***Decrease in fibrinogen and LDL-cholesterol levels upon supplementation of diet with*

*Lactobacillus plantarum* in subjects with moderately elevated cholesterol. *Atherosclerosis*, 137, s. 437–438.

**Cannon, J.P. a kol. (2005):** *Pathogenic relevance of Lactobacillus: a retrospective review of over 200 cases.* *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 24, s. 31–40.

**Coconnier, M.H., Klaenhammer, T.R., Kerneis, S., Bernet, M.F., Servin, A.L. (1992):** *Proteinmediated adhesion of Lactobacillus acidophilus BG2FO4 on human enterocyte and mucus-secreting cell lines in culture.* *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, s. 2034–2039.

**Coconnier, M.–H., Bernet, M.–F., Kernéis, S., Chauvière, G., Fourniat, J., Servin, A.L. (1993):** *Inhibition of adhesion of enteroinvasive pathogens to human intestinal Caco-2 cells by Lactobacillus acidophilus strain LB decreases bacterial invasion.* *FEMS Microbiol. Lett.*, 110, s. 299–305.

**Coconnier, M.–H., Lievin, V., Lorrot, M., Servin, A.L. (2000):** *Antagonistic activity of Lactobacillus acidophilus LB against intracellular Salmonella enterica serovar Typhimurium infecting human enterocyte–like Caco-2/TC–7 cells.* *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, s. 1152–1157.

**Collado, M.C., Gueimonde, M., Sanz, Y., Salminen, S. (2006):** *Adhesion properties and competitive pathogen exclusion ability of bifidobacteria with acquired acid resistance.* *J. Food Protect.*, 69, s. 1675–1679.

**COPE (2009):** <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?key=L929> (28.11.2012)

**FAO/WHO (2001):** *Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria.* [http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/en/probiotics.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf) (12.11.2012).

**Felley, C.P., Corthesy–Theulaz, I., Rivero, J.L., Sipponen, P., Kaufmann, M., Bauerfeind, P., Wiesel, P.H., Brassart, D., Pfeifer, A., Blum, A.L., Michetti, P.**

(2001): *Favourable effect of an acidified milk (LC-1) on Helicobacter pylori gastritis in man.* Eur. J. Gastroenterol. Hepatol., 13, s. 25–29.

**Fogh, J., Fogh, J.M., Orfeo, T. (1977):** *One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice.* J. Natl. Cancer Inst., 59, s. 221–226.

**Frece, J., Kos, B., Svetec, I.K., Zgaga, Z., Mrsa, V., Suskovic, J. (2005):** *Importance of S-layer proteins in probiotic activity of Lactobacillus acidophilus M92.* J. Appl. Microbiol., 98, s. 285–292.

**Fuller, R. (1991):** *Probiotics in human medicine.* Gut, 32, s. 439–442.

**Garrote, G.L., Delfederico, L., Bibiloni, R., Abraham, A.G., Pérez, P.F., Semorile, L., De Antoni, G.L. (2004):** *Lactobacilli isolated from kefir grains: evidence of the presence of S-layer proteins.* J. Dairy Res., 71, s. 222–230.

**Granato, D., Bergonzelli, G.E., Pridmore, R.D., Marvin, L., Rouvet, M., Corthésy-Theulaz, I.E. (2004):** *Cell surface-associated elongation factor Tu mediates the attachment of Lactobacillus johnsonii NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucins.* Infect. Immun., 72, s. 2160–2169.

**Greene, J.D., Klaenhammer, T.R. (1994):** *Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cells.* Appl. Environ. Microbiol., 60, s. 4487–4494.

**Guandalini, S., Pensabene, L., Zikri, M.A., Dias, J.A., Casali, L.G., Hoekstra, H., Kolacek, S., Massar, K., Micetic-Turk, D., Papadopoulou, A., de Sousa, J.S., Sandhu, B., Szajewska, H., Weizman, Z. (2000):** *Lactobacillus GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: a multicenter European trial.* J. Ped. Gastroenterol. Nutr., 30, s. 54–60.

**Gueimonde, M., Noriega, L., Margolles, A., de los Reyes-Gavilan, C.G., Salminen, S. (2005):** *Ability of Bifidobacterium strains with acquired resistance to bile to adhere to human intestinal mucus.* Int. J. Food Microbiol., 101, s. 341–346.

**Gupta, P., Andrew, H., Kirschner, B.S., Guandalini, S. (2000):***Is Lactobacillus GG helpful in children with Crohn's disease? Results of a preliminary, open-label study.* J. Ped. Gastroenterol. Nutr., 31, s. 453–457.

**Guslandi, M., Mezzi, G., Sorghi, M., Testoni, P.A. (2000):***Saccharomyces boulardii in maintenance treatment of Crohn's disease.* Digestive Dis. Sci., 45, s. 1462–1464.

**Hurmalainen, V., Edelman, S., Antikainen, J., Baumann, M., Lähtenmäki, K., Korhonen, T.K. (2007):** *Extracellular proteins of Lactobacillus crispatus enhance activation of human plasminogen.* Microbiology, 153, s. 1112–1122.

**Hynönen, U., Westerlund–Wikström, B., Palva, A., Korhonen, T. (2002):** *Identification by flagellum display on epithelial cell and fibronectin–binding function in the SlpA surface protein of Lactobacillus brevis.* J. Bacteriol., 184, s. 3360–3367.

**Chauvière, G., Coconnier, M.–H., Kernéis, S., Darfeuille–Michaud, A., Joly, B., Servin, A.L. (1992):** *Competitive exclusion of diarrheagenic Escherichia coli (ETEC) from human enterocyte–like Caco-2 cells by heat–killed Lactobacillus.* FEMS Microbiol. Lett., 70, s. 213–217.

**Chauviere, G., Coconnier, M.H., Kerneis, S., Fourniat, J., Servin, A.L. (1992):***Adhesion of human Lactobacillus acidophilus strain LB to human enterocyte-like Caco-2 cells.* J. Gen. Microbiol., 138 (Part 8), s. 1689–1696.

**Isolauri, E., Sütas, Y., Kankaanpää, P., Arvilommi, H., Salminen, S. (2001):***Probiotics: effects on immunity.* Am. J. Clin. Nutr., 73, s. 444–445.

**Jankowska, A., Laubitz, D., Antushevich, H., Zabielski, R., Grzesiuk, E. (2008):** *Competition of Lactobacillus paracasei with Salmonella enterica for adhesion to Caco-2 cells.* J. Biomed. Biotechnol., 2008.  
<http://www.hindawi.com/journals/jbb/2008/357964/>(25.11.2012).

**Kaila, M., Isolauri, E., Soppi, E., Virtanen, E., Laine, S., Arvilommi, H. (1992):** *Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human Lactobacillus strain.* Ped. Res., 32, s. 141–144.

**Kalliomäki, M., Salminen, S., Arvilommi, H., Kero, P., Koskinen, P., Isolauri, E. (2001b):** *Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial.* Lancet, 357, s. 1076–1079.

**Kankaanpää, P., Tuomola, E., El-Nezami, H., Ahokas, J., Salminen, S.J. (2000):** *Binding of aflatoxin B<sub>1</sub> alters the adhesion properties of Lactobacillus rhamnosus strain GG in a Caco-2 model.* J. Food Prot., 63, s. 412–414.

**Kapczynski, D.R., Meinersmann, R.J., Lee, M.D. (2000):** *Adherence of Lactobacillus to intestinal 407 cells in culture correlates with fibronectin binding.* Curr. Microbiol., 41, s. 136–141.

**Klayraung, S., Okonogi, S. (2009):** *Antibacterial and antioxidant activities of acid and bile resistant strains of Lactobacillus fermentum isolatér from Miang.* Braz. J. Microbiol., 40, s. 757–766.

**Kononen, E., Wade, W.G. (2007):** *Propionibacterium, Lactobacillus, Actinomyces, and other non-sporeforming anaerobic gram-positive rods.* In: Murray, P.R. (ed.), *Manual of clinical microbiology.* ASM Press, Washington, DC., s. 872–888.

**Lahtinen, S.J., Saarinen, N.M., Ämmälä, J., Mäkelä, S.I., Salminen, S., Ouwehand, A.C. (2002):** *Interactions between lignans and probiotics.* Microb. Ecol. Health Dis., 14, s. 106–109.

**Larsen, N., Nissen, P., Willats, W.G. (2007):** *The effect of calcium ions on adhesion and competitive exclusion of Lactobacillus ssp. and E. coli O138.* Int. J. Food Microbiol., 114, s. 113–119.

**Lee, J.H., Valeriano, V.D., SHin, Y.-R., Chae, J.P., Kim, G.-B., Ham, J.-S., Chun, J., Kang, D.-K. (2012):** *Genome sequence of Lactobacillus mucosae LM1, isolated from piglet feces.* J. Bacteriol., 194, s. 4766

**Lee, Y.-K., Puong, K.-Y., Ouwehand, A.C., Salminen, S. (2003):** *Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli.* J. Med. Microbiol., 52, s. 925 – 930.

**Lehto, E.M., Salminen, S. (1997):** *Adhesion of two Lactobacillus strains, one Lactococcus and one Propionibacterium strain to cultured human intestinal Caco-2 cell line.* Bioscience Microflora, 16, s. 13–17.

**Lehto, E.M., Salminen, S.J. (1997):** *Inhibition of Salmonella typhimurium adhesion to Caco-2 cell cultures by Lactobacillus strain GG spent culture supernate: only a pH effect?* FEMS Immunol. Med. Microbiol., 18, s. 125–132.

**Lichy, J.H., Modi, W.S., Seaunez, H.N., Howell, P.M. (1992):** *Identification of a human chromosome 11 gene which is differentially regulated in tumorigenic and non-tumorigenic somatic cell hybrids of HeLa cells.* Cell Growth Differ., 3, s. 541–548.

**Link-Amster, H., Rochat, F., Saudan, K.Y., Mignot, O., Aeschlimann, J.M. (1994):** *Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake.* FEMS Immunol. Med. Microbiol., 10, s. 55–64.

**Ma, Y.-L., Guo, T., Xu, Z.-R., You, P., Ma, J.-F. (2006):** *Effect of Lactobacillus isolates on the adhesion of pathogens to chicken intestinal mucus in vitro.* Lett. Appl. Microbiol., 42, s. 369 – 374.

**Madigan, M.T. a kol. (2006):** *Prokaryotic diversity: the bacteria.* In: Madigan, M.T., Martinko, J.M. (ed.), *Brock: biology of microorganisms.* Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, s. 329–418.

**Lahtinen, S. a Ouwehand, A. (2009):** *Mechanisms of probiotics.* In: Lee, Y.K., a Salminen, S. (ed.), *Handbook of probiotics and prebiotics.* Hoboken: John Wiley&Sons, s. 377–440.

**Maggi, L., Mastromarino, P., Macchia, S., Brigidi, P., Pirovano, F., Matteuzzi, D., Conte, U. (2000):** *Technological and biological evaluation of tablets containing different strains of lactobacilli for vaginal administration.* Eur. J. Pharm. Biopharm., 50, s. 389–395.

**Majamaa, H., Isolauri, E. (1997):** *Probiotics: a novel approach in the management of food allergy.* J. Allergy Clin. Immunol., 99, s. 179–186.

**Malchow, H.A. (1997):** *Crohn's disease and Escherichia coli.* J. Clin. Gastroenterol., 25, s. 653–658.

**Masters, J.R. (2002):** *HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly.* Nat. Rev. Cancer, 2, s. 315–319.

**Mattila-Sandholm, T., Blum, S., Collins, J.K., Crittenden, R., de Vos, W., Dunne, C., Fondén, R., Grenov, G., Isolauri, E., Kiely, B., Marteau, P., Morelli, L., Ouwehand, A., Reniero, R., Saarela, M., Salminen, S., Saxelin, M., Schiffrin, E., Shanahan, F., Vaughan, E., von Wright, A. (1999):** *Probiotics: towards demonstrating efficacy.* Trends Food Sci. Technol., 10, s. 393–399.

**Mc-Groarty, J.A., Reid, G. (1988):** *Detection of Lactobacillus substance that inhibits E. coli.* Can. J. Microbiol., 34, s. 974–978.

**Miyoshi, Y., Okada, S., Uchimura, T., Satoh, E. (2006):** *A mucus adhesion promoting protein, MapA, mediates the adhesion of Lactobacillus reuteri to Caco-2 human intestinal epithelial cells.* Biosci. Biotechnol. Biochem., 70, s. 1622–1628.

**Moy, T.I., Mylonakis, E., Calderwood, S.B., Ausubeli, F.M. (2004):** *Cytotoxicity of hydrogen peroxide produced by Enterococcus faecium.* Infect. Immun., 72, s. 4512–4520.

**Nagao, F., Nakayama, M., Muto, T., Okumura, K. (2000):** *Effects of a fermented milk drink containing Lactobacillus casei strain Shirota on the immune system in healthy human subjects.* Biosci. Biotechnol. Biochem., 64, s. 2706–2708.



**Niedzielin, K., Kordecki, H., Birkenfeld, B. (2001):** *A controlled, double-blind, randomized study on the efficacy of Lactobacillus plantarum 299v in patients with irritable bowel syndrome.* Eur. J. Gastroenterol. Hepatol., 13, s. 1143–1147.

**Operation                      Instruction                      Guide                      JSM-7401F                      FESEM.**  
<http://ncf.colorado.edu/instdocs/documentation/FESEM/FESEMInstructions.pdf>(23.11.2012)

**Orrhage, K., Lidbeck, A., Rafter, J. (2005):** *Influence of the probiotics, lactobacilli and bifidobacteria on gastrointestinal disorders in adults.* In: Hill, M. J. (ed.). *Role of gut bacteria in human toxicology and pharmacology.* Taylor & Francis e-Library, London, s. 256–257.

**Ouwehand, A.C., Niemi, P., Salminen, S.J. (1999):** *The normal faecal microflora does not affect the adhesion of probiotic bacteria in vitro.* FEMS Microbiol. Lett., 177, s. 35–38.

**Ouwehand, A.C., Isolauri, E., Kirjavainen, P.V., Toliko, S., Salminen, S.J. (2000):** *The mucus binding of Bifidobacterium lactis Bb12 is enhanced in the presence of Lactobacillus GG and Lact. delbrueckii subsp. bulgaricus.* Lett. Appl. Microbiol., 30, s. 10–13.

**Ouwehand, A.C., Tuomola, E.M., Tölkö, S., Salminen, S. (2001):** *Assessment of adhesion properties of novel probiotic strains to human intestinal mucus.* Int. J. Food Microbiol., 64, s. 119–126.

**Ouwehand, A.C., Tölkö, S., Salminen, S. (2001):** *The effect of digestive enzymes on the adhesion of probiotic bacteria in vitro.* J. Food Sci., 66, s. 856–859.

**Ouwehand, A.C., Salminen, S., Isolauri, E. (2002):** *Probiotics: an overview of beneficial effects.* Antonie Leeuwenhoek, 82, s. 279–289.

**Ouwehand, A.C., Vesterlund, S. (2003):** *Health aspects of probiotics.* Idrugs, 6, s. 573–580.

**Ouwehand, A.C., Parhiala, R., Salminen, S., Rantala, A., Huhtinen, H., Sarparanta, H., Salminen, E. (2004):***Influence of the endogenous mucosal microbiota on the adhesion of probiotic bacteria in vitro.* Microb. Ecol. Health Dis., 16, s. 202–204.

**Pignata, S., Maggini, L., Zarrilli, R., Rea, A., Acquaviva, A.M. (1994):** *The enterocyte-like differentiation of the Caco-2 tumor cell line strongly correlates with responsiveness to cAMP and activation of kinase A pathway.* Cell Growth Differ., 5, s. 967–973.

**Pinto, M., Robine–Leon, S., Appay, M.D., Kedinger, M., Triadou, N., Dussaulx, E., Lacroix, B., Simon–Assmann, P., Haffen, K., Fogh, J., Zweibaum, A. (1983):** *Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture.* Biol. Cell., 47, s. 323–330.

**Pretzer, G., Snel, J., Molenaar, D., Wiersma, A., Bron, P.A., Lambert, J., de Vos, W.M., van der Meer, R., Smits, M.A., Kleerebezem, M. (2005):** *Biodiversity-based identification and functional characterization of the mannose-specific adhesin of Lactobacillus plantarum.* J. Bacteriol., 187, s. 6128–6136.

**Reichelt, R. (2007):***Scanning Electron microscopy.* In: Hawkes, P.W., Spence, J.C.H. (ed.) *Science of microscopy.* Springer Science+Business Media, LCC, New York, s. 133 – 272.

**Riedel, C.U., Foata, F., Goldstein, D.R., Blum, S., Eikmanns, B.J. (2006):***Interaction of bifidobacteria with Caco-2 cells—adhesion and impact on expression profiles.* Int. J. Food Microbiol., 110, s. 62–68.

**Rojas, M., Ascencio, F., Conway, P.L. (2002):** *Purification and characterization of a surface protein from Lactobacillus fermentum 104R that binds to porcine small intestinal mucus and gastrin mucin.* Appl. Environ. Microbiol., 68, 2330–2336.

**Roos, S., Jonsson, H. (2002):** *A high-molecular-mass-cell-surface protein from Lactobacillus reuteri 1063 adheres to mucus components.* Microbiology, 148, s. 433–442.

**Roos, S., Karner, F., Axelsson, L., Jonsson, H. (2000):** *Lactobacillus mucosae* sp. nov., a new species with in vitro mucus-binding activity isolated from pig intestine. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 50, s. 251 – 258.

**Ross, S., Aleljung, P., Robert, N., Lee, B., Wadström, T., Lindberg, M., Jonsson, H. (1996):** A collagen binding protein from *Lactobacillus reuteri* is part of an ABC transporter system? FEMS Microbiol. Lett., 144, s. 33–38.

**Savage, D.C. (1992):** Growth phase, cellular hydrophobicity, and adhesion in vitro of lactobacilli colonizing the keratinizing gastric epithelium in the mouse. Appl. Environ. Microbiol., 58, s. 1992–1995.

**Saavedra, J.M., Bauman, N.A., Oung, I., Perman, J.A., Yolken, R.H. (1994):** Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. Lancet, 344, s. 1046–1049.

**Servin, A.L. (2004):** Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. FEMS Microbiol. Rev., 28, s. 405–440.

**Shornikova, A-V., Casas, I., Mykkänen, H., Salo, E., Vesikari, T. (1997):** Bacteriotherapy with *Lactobacillus reuteri* in rotavirus gastroenteritis. Ped. Infect. Dis. J., 16, s. 1103–1107.

**Schneitz, C., Nuotio, L., Lounatmaa, K. (1993):** Adhesion of *Lactobacillus acidophilus* to avian intestinal epithelial cells mediated by the crystalline bacterial cell surface layer (S-layer). J. Appl. Bacteriol., 74, s. 290–294.

**Slover, C.M., Danziger, L. (2008):** *Lactobacillus*: a Review. Clin. Microbiol. Newslett., 30, s. 23–27.

**Stanbridge, E.J., Flandermeyer, R.R., Daniels, D.W., Nelson-Rees, W.A. (1981):** Specific chromosome loss associated with the expression of tumorigenicity in human cell hybrids. Somat. Cell Genet., 7, s. 699–712.

**Stickler, D.J., Lear, J.C., Morris, N.S., a kol. (2006):** *Observations on the adherence of Proteus mirabilis onto polymer surface.* J. Appl. Microbiol., 100, s. 1028–1033.

**Sugita, T., Togawa, M. (1994):** *Efficacy of Lactobacillus preparation Biolactis powder in children with rotavirus enteritis.* Jpn. J. Pediatr., 47, s. 2755–2762.

**Summanen, P. a kol. (1993):** *Appendix A,* In: Summanen, P. a kol. (ed.). *Wadsworth anaerobic bacteriology manual.* Star Publishing Company, Belmont, CA, s. 145.

**Sylvester, F.A., Philpott, D., Gold, B., Lastovica, A., Forstner, J.F. (1996):** *Adherence to lipids and intestinal mucin by a recently recognized human pathogen, Campylobacter upsaliensis.* Infect. Immun., 64, s. 4060–4066.

**Tobola, T., Virkola, R., Westerlund, B., Björkman, Y., Sillanpää, J., Vartio, T., Kalkkinen, N., Korhonen, T.K. (1995):** *A Collagen-Binding S-layer protein in Lactobacillus crispatus.* Appl. Environ. Microbiol., 61, s. 2467–2471.

**Tuomola, E.M., Ouwehand, A.C., Salminen, S.J. (2000):** *Chemical, physical and enzymatic pre-treatments of probiotic lactobacilli alter their adhesion to human intestinal mucus glycoproteins.* Int. J. Food Microbiol., 60, s. 75–81.

**van Pijkeren, J.P., Canchaya, C., Ryan, K.A., Li, Y., Claesson, M.J., Sheil, B., Steidler, L., O'Mahony, L., Fitzgerald, G.F., van Sinderen, D., O'Toole, P.W. (2006):** *Comparative and functional analysis of sortase-dependent proteins in the predicted secretome of Lactobacillus salivarius UCC118.* Appl. Environ. Microbiol., 72, s. 4143–4153.

**Walter, J., Chagnaud, P., Tannock, G.W., Loach, D.M., Dal Bello, F., Jenkinson, H.F., Hammes, W.P., Hertel, C. (2005):** *A high-molecular-mass surface protein (Lsp) and methionine sulfoxide reductase B (MsrB) contribute to the ecological performance of Lactobacillus reuteri in the murine gut.* Appl. Environ. Microbiol., 71, s. 979–986.

**Wang, B., Wei, H., Yuan, J., Li, Q., Li, Y., Li, N., Li, J. (2007):** *Identification of a surface protein from Lactobacillus reuteri JCM1081 that adheres to porcine gastric mucin and human enterocyte-like HT-29 cells*, Curr. Microbiol, 57, s. 33–38.

**Zárate, G., Morata de Ambrosini, V., Perez Chaia, A., Gonzalez, S. (2002):** *Some factors affecting the adherence of probiotic Propionibacterium acidipropionici CRL 1198 to intestinal epithelial cells*. Can. J. Microbiol., 48, s. 449–457.

**Zárate, G., Nader–Macias, M.E. (2006):** *Influence of probiotic vaginal lactobacilli on in vitro adhesion of urogenital patogen to vaginal epithelial cells*. Lett. Appl. Microbiol., 43, s. 174–180.

## 7 Seznam zkratk a symbolů

16S rDNA	16S ribozomální deoxyribonukleotidová kyselina
CFU	„Colony forming unit“, jednotka tvořící kolonie
CCM	„Czech Collection of Microorganisms“, Česká sbírka mikroorganismů
DMEM	„Dulbecco’s modified Eagle’s Medium“
DNA	Kyselina deoxyribonukleová
ECACC	„European Collection of Cell Cultures“, Evropská sbírka buněčných kultur
FAO	„Food and Agriculture Organization of the United Nations“, Potravinářská a polnohospodářská organizace
FESEM	Skenovací elektronová mikroskopie v pulzním poli
G+	Gram pozitivní bakterie
GIT	Gastrointestinální trakt
MEM	„Minimum Essential Medium Eagle“
MRS	de Man, Rogosa, Sharpe
PBS	„Phosphate buffered saline“, fosfátový pufovaný fyziologický roztok
PFGE	Gelová elektroforéza v pulzním elektrickém poli
RDP	„Ribosomal Database Project“
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
WHO	„World Health Organization“, Světová zdravotnická organizace