

HONG H.A., DUC LE H., CUTTING S.M.: FEMS Microbiology Review 29, 813-835 (2005).
 HONG H.A., HUANG J.-M., KHANEJA R., HIEP L.V., URDACI M.C., CUTTING S.M.: Journal of Applied Microbiology 105, 510-520 (2008).
 HUANG H. Y., HUANG S. Y., CHEN P. Y., KING A. E., LIN Y. P., TSEN J. H.: Current Microbiology 54, 396 - 404 (2007).
 HYRONIMUS B., MARREC C., HADJ SASSI A., DESCHAMPS A.: International Journal of Food Microbiology 61, 193 - 197 (2000).
 KITAHARA K., SUZUKI J.: Journal of Applied Bacteriology 9, 59-71 (1963).
 LOSADA M. A., OLLEROS T.: Nutrition Research 22, 71 - 84 (2002).
 MANDEL D.R., EICHAS K., HOLMES J.: <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/10/1>, staženo 8. 4. 2010.
 OGGIONI M. R., CIABATTINI A., CUPPONE A. M., POZZI G.: Vaccine 21, S2/96 - S2/101 (2003).
 PATEL A. K., AHIRE J. J., PAWAR S. P., CHAUDHARI B. L., CHINCHOLKAR S. B.: Food Research International 42, 505 - 510 (2009).
 SANDERS M. E., MORELLI L., TOMPKINS T. A.: Food Science and Food Safety 2, 101 - 110 (2003).
 VASILJEVIC T., SHAH N. P.: International Dairy Journal 18, 714 - 728 (2008).
www.bacterio.cict.fr List of Procarotic names with Standing in Nomenclature, staženo 8.4. 2010.

Přijato do tisku 22.4.2010

Lektorováno 11.5.2010

STUDIUM IMUNOMODULAČNÍCH ÚČINKŮ BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ

Drbohlav J.¹, Bártová J.², Šalaková A.¹, Roubal P.¹, Kokešová A.³

¹ Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o. Praha

² Výzkumný ústav stomatologický Praha

³ Klinika dětské chirurgie 2.LF UK a Fakultní nemocnice v Motole Praha

Study of immunologic activities lactic acid bacteria

Abstrakt

Bakterie mléčného kvašení (LAB) jsou významnou skupinou mikroorganismů s potenciálem ovlivňovat lidské zdraví. Cílem tohoto výzkumu bylo zobjektivizovat působení bakteriálních kmenů *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* a *Bifidobacterium lactis* monitorováním jejich schopnosti imunomodulace na základě stanovení tvorby cytokinů metodou multiplexové analýzy RayBio Human Inflammatory Array.

Abstract

Lactic acid bacteria (LAB) are a significant group of microorganisms with potential to effect human health. Aim of this research was to objectify the activity of *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Strepto-*

coccus thermophilus and *Bifidobacterium lactis* bacterial strains by monitoring their ability to modulate immunity on the principle of determination cytokines production using method multiplex analysis RayBio Human Inflammatory Array.

1. Úvod

Používání bakterií podporujících zdraví pro terapeutické účely má v medicíně dlouhou tradici. V posledních letech značně vzrostl počet klinických studií, ve kterých se vědecky zkoumá prevence, zmírnění nebo léčba onemocnění a to nejen proto, aby se našel důkaz pro zdravotní tvrzení pro určitou skupinu "zdravých spotřebitelů", ale také proto, aby se testovalo použití pro- a prebiotik v medicíně (v prevenci a léčbě). Výsledkem je, že počet studií, které splňují tyto požadavky, se v posledních letech značně zvýšil, a tak řadu zdravotních tvrzení ve spojení s pro- a prebiotiky lze charakterizovat jako tvrzení založená na důkazu.

Jednou z prvních prací s použitím probiotického kmene *E. coli* před více než 20ti lety, jejíž výsledky byly publikovány, jsou práce MUDr. Lodinové - Žádníkové, R. (2002), která zjistila dlouhodobý efekt perorálního osídlení na signifikantní snížení výskytu alergií. Další studie potvrdila prioritní volbu živých probiotických bakterií při doplňkové léčbě akutního průjmového onemocnění dětí - P. Tláškal et al. (2003). Randomizovaná a částečně zaslepená studie byla provedena na ambulantních pracovištích dětských lékařů v Praze u 113 dětí s nekomplikovaným akutním průjmovým onemocněním. Základní léčbou onemocnění byl dietní režim a děti doplňkově dostávaly placebo nebo probiotikum (*Lbc. Acidophilus* a *Lbc. Rhamnosus*) nebo metabolity střevních bakterií (*E. coli*, *Str. faecalis*, *Lbc. Acidophilus*, *Lbc. Helveticus*). V 62,8 % byla elektronovým mikroskopem prokázána virová etiologie onemocnění, 5,3 % infekcí bylo bakteriálních, 15 % smíšených. V 16,8 % nebyla etiologie průjmu určena. 48,7 % všech průjmů vyvolaly rotaviry, které se po desetidenní léčbě vyskytovaly ve stolici dětí ještě v 18,6 % případů. Při významné úpravě virologických nálezů se neuplatňoval faktor léčby. Klinicky byla prokázána při podání probiotika významně kratší doba úpravy konsistence stolice (placebo 5,45 ± 2,33 dne, probiotikum 4,00 ± 2,02 dne, metabolity 6,14 ± 3,2 dne), ale nebyla prokázána změna ve frekvenci stolice. Ústup meteorismu byl druhý den významný (p<0,03) u dětí léčených probiotikem. Statisticky nebyl prokázán významnější rozdíl hodnot IgA stolice a IgA slin v závislosti na způsobu použité léčby.

Celá řada dalších prací popisuje příznivý vliv probiotik na střevní mikroflóru. Jejím prostřednictvím ovlivňují náš zdravotní stav včetně ovlivnění imunitního systému. Imunitní systém se podílí na zajišťování tří základních procesů v organismu: obranyschopnost - ochrana proti infekci, homeostáze- udržení identity organismu a imunitním dohledem- je úzce propojen s nervovým a endokrinním systémem a zajišťuje složité regulační reakce organismu.

Poruchy imunitního systému mohou vést ke klinicky manifestním onemocněním - alergie, autoimunity, zánětlivá onemocnění.

Podle toho, zda se v ejetorové části imunitní reakce více uplatní humorální faktory nebo buňky, rozděluje se imunita na humorální (B - lymfocyty) nebo buněčnou (T- lymfocyty). Humorální imunita je zajišťována složkami séra - protilátkami a systémem bílkovin - komplementem.

V buněčné imunitě hrají významnou úlohu cytokiny. V devadesátých letech bylo prokázáno, že funkční subpopulace T lymfocytů, které nemohou být odlišeny fenotypově podle jejich povrchových molekul, mohou být definovány podle tvorby cytokinů. Na základě cytokinového profilu rozlišujeme TH1 klon, který tvoří převážně IL-2 a IFN- γ a jsou odpovědné za reakce oddálené přecitlivělosti a TH2 klon, pro něž je charakteristická tvorba IL-4 a které regulují funkci B lymfocytů (Mossman a Coffman, 1989).

Nové terapeutické postupy při léčbě některých onemocnění by měly být založeny na podávání probiotických bakterií s léčebným efektem specifickým pro jednotlivá onemocnění. K tomu směřují i experimentální pokusy. Antialergický efekt prokázaly horkem zabitě bakterie *Lactobacillus pentosus* strain S-PT84 modulací TH1/TH2 odpovědi zvýšenou tvorbou regulačního cytokinu IL-10. Antialergický efekt laktobacilů v ovlivnění TH1/TH2 tvorby cytokinů je ovlivňován působením jejich kmenů a ne druhů (Fujiwara D. et al., 2004). Další experimentální práce prokazují, že orálně aplikovaný kmen *Lactobacillus acidophilus* L-92 reguluje tvorbu jak TH1, tak TH2 cytokinů a tvorbu TGF-beta, který je asociován s aktivací regulačních T lymfocytů - Treg (Torii et al., 2007). Tyto experimentální údaje naznačují, že laktobacily mají imunomodulační efekt na aktivaci Treg lymfocytů aktivací TGF beta.

Studie Gueimonde et al. (2006) se zabývala charakterizací účinku konzumace *Lactobacillus rhamnosus* GG matkou na přenos a kolonizaci bifidobakteriemi u novorozenců. Specifické změny v přenosu a počáteční kolonizaci bifidobakterií u dětí byly ovlivněny příznivě přítomností *Lactobacillus rhamnosus* u matky.

Nový terapeutický přístup v léčbě IBD (zánětlivé onemocnění střev) je založen na podávání probiotických bakterií. Periferní mononukleární buňky zdravých jedinců byly inkubovány izolovanou DNA z 8 probiotických kmenů a s bakteriální DNA izolovanou ze stolice (Lammers KM et al., 2003). Výsledky prokázaly, že DNA izolovaná z bifidobakterií indukovala tvorbu IL-10 mononukleárními buňkami izolovanými z periferní krve zdravých dárců a snižovala tvorbu IL-1beta. Imunostimulační aktivita *Bifidobacterium bifidum* je dána jeho buněčnými složkami a ne aktivní sekrecí bakteriálních složek Park et al. (2002).

Kokešová a spol. (v tisku) sledovala in vitro aktivaci mononukleárních buněk izolovaných z periferní krve nepatogenními probiotickými bakteriemi *E.coli Nissle*, *E coli* O83 a *Lactobacillus casei* a zjistila aktivaci tvorby celé řady cytokinů.

2. Experimentální část

2.1. Cíl studie

Cílem naší studie bylo v podobném systému sledovat tvorbu cytokinů po aktivaci in vitro mononukleárních buněk periferní krve probiotickými bakteriemi *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* a *Enterococcus faecium*.

2.2. Materiál a metodika

Bakteriální kmeny a jejich příprava:

Lactobacillus casei - testovací kmen - použit jako standard
Lactobacillus acidophilus CCDM 92

Bifidobacterium lactis CCDM 94

Enterococcus faecium CCDM 922

Bakteriální kmeny byly stacionárně kultivovány v mléce při teplotě 37 °C po dobu 16 hodin, přeočkovány do MRS bujónu a kultivovány při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Kmen *Lbc. Casei* byl kultivován pouze v MRS médiu. Nakultivované kmeny byly odstředovány (3000 ot./min.) po dobu 15 minut a následně promyty fyziologickým roztokem. Tento postup byl 3x opakován. Následně do promytých bakterií bylo přidáno médium X-Vivo (Cambrex) v množství 3 ml. Poté byly stanoveny počty KTJ kultivační metodou na MRS agar (kultivace při 37 °C po dobu 72 hodin).

2.3. Separace mononukleárních buněk z buffy coat zdravých dárců krve pomocí Ficoll - Paque gradientu

Mononukleární buňky byly izolovány z buffy coat metodou izolace na gradientu roztoku Histopaque popsané Boyumem (1968). Práce probíhala za sterilních podmínek ve sterilním boxu.

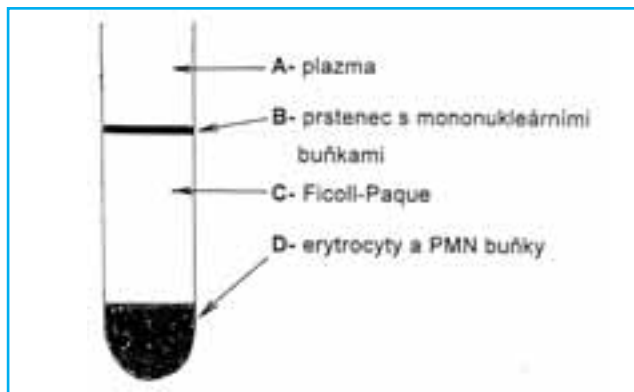
Buffy coat, získaný od zdravých dárců krve z Ústavu hematologie a krevní transfuze po separaci krevních destiček, byl naředěn 1:1 tkáňovým médiem X-Vivo (Cambrex) a navrstven na roztok Histopaque (Sigma g=1,077)

Následovala centrifugace 30 min. při 600g. Při centrifugaci dochází k rozvrstvení krve na základě hustotního gradientu viz obrázek 1.

- A) Vrstva A obsahuje zbytky média, které odsajeme a dále s ní nepracujeme.
- B) Vrstvu B tvoří mléčné bílý prstenec mononukleárních buněk, tuto vrstvu pečlivě odsajeme a přeneseme do sterilních umělohmotných zkumavek o objemu 50 ml.
- C) Vrstvu C tvoří Ficoll-Paque.
- D) Vrstva D obsahuje sedimentované polymorfonukleární buňky a erythrocyty.

Zpracování buněk po separaci:

K mononukleárním buňkám (v 50 ml umělohmotných zkumavkách) jsme přidali X- Vivo médium a následně centrifugovali 10 min při 400g. Supernatant jsme slili, peletu s buňkami na dně zkumavky jsme rozklepali, doplnili X- Vivo médiem do 50 ml a opět centrifugovali 10 min. při 200g.



Obr. 1 Izolace mononukleárních buněk pomocí gradientové centrifugace

Na počítání buněk jsme odpipetovali 50µl ze suspenze buněk a převedli do mikrozkuhavky (ependorfky) s 950 µl Türkova roztoku a řádně promíchali.

Koncentraci lymfocytů jsme stanovili spočítáním v Bürkerově komůrce. Počítali jsme v 50 čtvercích pomocí pravidla L. Buňky jsme naředili na koncentraci 10⁷ buněk/ml kultivačním X - Vivo médiem.

Mononukleární buňky separované z buffy coat (10⁷ buněk/ml) byly stimulovány s mitogeny a bakteriemi při 37 °C a 5% CO₂ v atmosféře po 3 a 5 dnů.

Po kultivaci byly supernatanty odebrány a zamrazeny.

2.4. Stanovení tvorby cytokinů metodou multiplexové analýzy RayBio Human Inflammatory array

- Nitrocelulózová membrána s navázanými protilátkami proti 40ti cytokinů byla blokována po dobu 30ti minut 1% roztokem BSA
- Blokující roztok odstraněn a na membránu aplikován 1 ml vzorků
- Inkubace 1 hodinu při pokojové teplotě
- Promytí standardními roztoky I (3x 5 min.) a II (2x5 min)
- Aplikace 1 ml biotinem konjugovaných protilátek na každou membránu

Tab. 1 Schéma pokusu

	Buňky (10 ⁷ JTK/ml)	Stimulace	Kultivační X-Vivo
<i>Lactobacillus casei</i>	200 µl	200 µl (konc.10 ⁹ JTK/ml)	1 600 µl
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	200 µl	200µl (konc.10 ⁹ JTK/ml)	1 600 µl
<i>Bifidobacterium lactis</i>	200 µl	200µl (konc.10 ⁹ JTK/ml)	1 600 µl
<i>Enterococcus faecium</i>	200 µl	200 µl (konc.10 ⁹ JTK/ml)	1 600 µl
Nestimulované buňky	100 µl	Pouze medium	1 800 µl

Tab. 2 Membrána s navázanými protilátkami proti cytokinům: Ray Bio® Human Inflammation Antibody Array 3 Map

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
POS	POS	NEG	NEG	EOTAXIN	ECOTAXIN-2	GCSF	GM-CSF	ICAM-1	IFN-	I-309	IL-1u
POS	POS	NEG	NEG	EOTAXIN	ECOTAXIN-2	GCSF	GM-CSF	ICAM-1	IFN-	I-309	IL-1u
IL-1β	IL-2	IL-3	IL-4	IL-6	IL-6sR	IL-7	IL-8	IL-10	IL-11	IL-12 p40	IL-12 p70
IL-1β	IL-2	IL-3	IL-4	IL-6	IL-6sR	IL-7	IL-8	IL-10	IL-11	IL-12 p40	IL-12 p70
IL-13	IL-15	IL-16	IL-17	IP-10	MCP-1	MCP-2	M-CSF	MIG	MIP-1	MIP-1	MIP-15
IL-13	IL-15	IL-16	IL-17	IP-10	MCP-1	MCP-2	M-CSF	MIG	MIP-1	MIP-1	MIP-15
RANTES	TOF-B1	TNF-α	TNF-β	s TNF R1	sTNF RII	PDGF-BB	TIMP-2	BLANK	BLANK	NEG	POS
RANTES	TOF-B1	TNF-α	TNF-β	s TNF R1	sTNF RII	PDGF-BB	TIMP-2	BLANK	BLANK	NEG	POS



Obr. 2 Výsledné stanovení cytokinů u 1. vzorku na membráně

- Inkubace 1 hodinu při pokojové teplotě
- Promytí standardními roztoky I (3x 5 min.) a II (2x 5 min)
- Aplikace 2 ml 1000x ředěného HRP konjugovaného straptavidinu
- Inkubace přes noc
- Promytí a vyvolání reakce
- Reakce byla vyvolána přidáním 250 ml detekčních roztoku D a C na každou membránu a po 2 minutách působení měřena na detektoru luminiscence Fudjifilm LAS-1000.
- Získaná data jsou zpracována obrazovou analýzou.

2.5. Hodnocení výsledků

Zjištěné výsledky po stimulaci:

Lactobacillus casei

3. den IL-1beta	velmi slabá reakce
IL-8	velmi slabá reakce
5. den IL-1beta	slabá tvorba
IL-2	slabá reakce
IL-8	slabá reakce

<i>Lactobacillus acidophilus</i>	
3. den	bez reakce
5. den IL-8	silná reakce
<i>Bifidobacterium lactis</i>	
3. den Rantes	slabá reakce
MIP-1alfa	slabá reakce
IL-8	silná reakce
5. den	bez reakce
<i>Enterococcus faecium</i>	
3. den IL-8	slabá reakce
Nestimulované buňky	
3. den	IL-8 Slabá reakce

Pro pokusy byly cíleně připraveny koncentrované suspenze bakteriálních buněk vybraných kmenů se záměrem výrazně podpořit aktivaci cytokinů. Vysoké počty bakterií (10^9 v 1 ml) vykázaly nespecifickou reakci testovacího kmene oproti výsledkům výzkumu Kokešová et al. (tisku), kde pro blokovaný pokus byl navržen model s nižší denzitou testovacího kmene (10^7). Denzita 10^7 pozitivně aktivovala široké spektrum cytokinů. Aktivace cytokinů vysokou denzitou bakteriálních buněk oproti předpokladu vykázala slabší reakci. Kmen *Lactobacillus acidophilus* po pátém dni a *Bifidobacterium lactis* po třetím dni vykázaly silnou aktivaci IL-8. Interleukin 8 je spojován v klinické praxi spojován s mediací zánětlivých procesů.

3. Závěr

Naše výsledky neodpovídají výsledkům, které získala ve stejném systému Dr. Kokešová (v tisku), když použila kmen *Lactobacillus casei*, který jsme použili jako standard. Výsledky byly zřejmě ovlivněny námi použitou vyšší koncentrací bakterií. Při použití vyšší koncentrace bakterií dochází k aktivaci prozáněťových cytokinů, proto je důležité hledat experimentálně takové koncentrace, které budou cíleně ovlivňovat tvorbu klonů T lymfocytů. Vzhledem k tomu, že probiotika jsou v současné době neustálou součástí propagace, se zdůrazňováním jejich pozitivního efektu na zažívání, domníváme se, že je důležité sledovat jejich imunomodulační účinky, které jsou dle našich zjištění závislé na použití jednotlivých kmenů. Považujeme za důležité cíleně sledovat tvorbu cytokinů po aktivaci probiotiky a hledat možnosti jejich ještě lepšího terapeutického efektu. Cílem další práce by mělo být nalezení vhodné koncentrace bakterií pro stimulaci mononukleárních buněk, abychom mohli získat standardní výsledky tvorby cytokinů a tím i zjištění, které klony TH lymfocytů jsou aktivovány.

Tato práce vznikla za podpory MŠMT při řešení výzkumného záměru MSM 2672286101.

Literatura:

LODINOVÁ-ŽÁDNÍKOVÁ R. (2002): Probiotika v pediatrii. Snížení rizika nosokomiálních infekcí perorálním osídlením probiotickým kmenem *E.coli* po narození a jeho vliv na frekvenci opakovaných infekcí a alergií po 10 a 20 letech. *Alergie*, 4, č. 4, s. 275-280.

- FUJIWARA D., INOUE S, WAKABAYASHI H., FUJII T. (2004): The anti-allergic effects of lactic acid bacteria are strain dependent and mediated by effects on both TH1/TH2 cytokine expression and balance. *Int Arch Allergy Immunol.*, 135, 205-215
- TLÁSKAL, P., KOKEŠOVÁ, A., SCHRAMLOVÁ, J. et al. (2003): Probiotika a metabolisme střevních bakterií v léčbě průjmového onemocnění dětí virové etiologie. VZ FN Praha Motol č. 00000064203/6041
- TORII A., TORII S., FUJIWARA S., et. al. (2007): *Lactobacillus acidophilus* kmen L-92 regulates the production of T1 cytokine as well as Th2 cytokines. *Allergol Int.*, 56(3):293-301
- GUIEMONDE M., SAKATA S., KALLIOMAKI M., ISOULARI E., BENNO Y., SALMINEN S. (2006): Effect of maternal consumption of lactobacillus GG on transfer and establishment of fecal bifidobacterial microbiota in neonates. *J. Pediatr Gastroenterol Nutr.*, 42(2),166-70
- LAMMERS KM., BRIDIGI P., VITALI B. et al. (2003): Immunomodulatory effects of probiotic bacteria DNA: IL-1 a IL-10 response in human peripheral blood mononuclear cells. *FEMS Immunol Med*, 38,(2),165-172
- PARK JH, UM JI, LEE et al. (2002): Encapsulated *Bifidobacterium bifidum* potentiates intestinal IgA production. *Cell Immunol*, 219,22.7
- BOYUM, A. (1968): Isolation of leucocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.*, 97, 31-50
- MOSSMANM T. R. AND COFFMAN R. L. (1989): TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann. Rev. Immunol.*, 7, 145-173

Přijato do tisku 20. 2. 2010

Lektorováno 4. 3. 2010

PRODUKCE BAKTERIOCINŮ A INHIBIČNÍ ÚČINKY VYBRANÝCH KMENŮ *STREPTOCOCCUS SALIVARIUS* SUBSP. *THERMOPHILUS*

Zuzana Vaňátková¹, Magda Doležalová¹, Jan Hrabě¹,
Vladimír Dráb²

¹ Ústav technologie a mikrobiologie potravin,
Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně,
Česká republika

² Výzkumný ústav mlékárenský - Milcom, a.s., Sběrka
mlékárenských mikroorganismů, Tábor, Česká republika

Bacteriocin production and inhibitory effects of chosen *Streptococcus thermophilus* strains

Abstrakt

Tato práce se zabývala produkcí bakteriocinů vybranými kmeny *Streptococcus thermophilus* a inhibičními účinky těchto streptokoků vůči *Bacillus subtilis* a *Listeria innocua*. Bylo využito celkem 11 kmenů *Str. thermophilus* a jeden kmen *B. subtilis* získané ze Sběrky mlékárenských mikroorganismů (CCDM) a po jednom kmeni *Str. thermophilus*, *Lb. sakei* a *L. innocua* získané z České sbírky mikroorganismů (CCM). Všechny použité kmeny streptokoků byly testovány na produkci bakteriocinu thermophilinu metodou PCR. Gen pro tvorbu thermophilinu (*Streptococcus ther-*