

# IMUNOMODULAČNÍ CHARAKTERISTIKY VYBRANÝCH KMENŮ BIFIDOBAKTERIÍ

Šalaková A.<sup>1</sup>, Bártová J.<sup>2</sup>, Drbohlav J.<sup>1</sup>, Roubal P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Výzkumný ústav mlékařenský s.r.o.

<sup>2</sup> Výzkumný ústav stomatologický

## IMMUNOMODULATORY CHARACTERISTICS SELECTED STRAINS OF BIFIDOBACTERIA

### Abstrakt

Výzkum byl zaměřen na imunomodulační charakteristiky vybraných kmenů bifidobakterií ze Sbírký mlékařských mikroorganismů Laktoflora® - *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*, *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*, *Bifidobacterium dentium* a *Bifidobacterium* sp.. Bylo stanovováno široké spektrum cytokinů s prozánětlivým i s protizánětlivým účinkem podporujících buněčnou i protilátkovou imunitu. Bylo zjištěno, že jednotlivé kmeny bifidobakterií působící na separované mononukleární krevní buňky stimulují produkci cytokinů zcela individuálním způsobem. Tyto vlastnosti kmenů bifidobakterií by bylo možno využívat v prevenci a k léčbě některých onemocnění.

### Abstract

The research was focused on the immunomodulatory characteristics selected strains of bifidobacteria from the Collection of Dairy Microorganisms Laktoflora® - *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, ***Bifidobacterium longum*** subsp. *infantis*, *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*, *Bifidobacterium dentium* and *Bifidobacterium* sp. Wide range of cytokines with pro-inflammatory and anti-inflammatory effects promoting cellular and humoral immunity were determined. It was found that different strains of bifidobacteria acted on separated mononuclear blood cells stimulated the production of cytokines completely by individual way. These properties of bifidobacteria could be used in prevention and treatment of some diseases.

### Úvod

Cílem naší práce bylo zkoumat, jaké imunomodulační vlastnosti mají probiotické kmeny bifidobakterií ze Sbírký mlékařských mikroorganismů Laktoflora®, která je součástí národního genofondu mikroorganismů.

Zda kmeny reagují s krevními mononukleárními buňkami všechny shodně nebo zda jsou mezi jednotlivými kmeny stejného druhu rozdíly ve stimulaci cytokinů a tím zda kmeny mohou mít specifický vliv v prevenci některých

onemocnění a pokusit se tak odpovědět na otázku, proč některým lidem probiotické mikroorganismy pomáhají v prevenci i v léčbě nemocí a jiní lidé pozitivní vliv probiotik nepocítují. Pro tento výzkum bylo vybráno 15 kmenů rodu *Bifidobacterium* (*B.*) ze Sbírký mlékařských mikroorganismů Laktoflora® *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. longum* subsp. *infantis*, *B. longum* subsp. *longum*, *B. dentium* a *Bifidobacterium* sp.

### *Bifidobacterium* - vlastnosti, benefity

*Bifidobacterium* je rod Gram-pozitivních, nepohyblivých bakterií, které se běžně vyskytují v trávicím traktu savců včetně člověka. Bifidobakterie jsou vesměs anaerobní, některé striktně, jiné mikroaerofilní či tolerantní vůči kyslíku. Tvoří fruktozo-6-fosfát fosfoketolázu, která se podílí na fermentaci sacharidů. Přítomnost tohoto enzymu je jedním z identifikačních znaků rodu *Bifidobacterium* (Ventura a kol., 2004).

Bakterie rodu *Bifidobacterium* se používají jako doplňkové mikroorganismy při přípravě fermentovaných mlék nebo jogurtů (Kurmann, 1991). Bifidobakterie jsou spojovány s významnými účinky na lidské zdraví a jsou aplikovány jako bakterie probiotické povahy. Regulují střevní mikrobiální homeostázu (Patel, Lin, 2010), modulují imunologickou odpověď (O'Flaherty, 2012), mají schopnost inhibovat prokarcinogenní aktivitu (Feyisetan a kol., 2012), produkují vitamíny (Le Blance a kol., 2011).

Celá řada výzkumných prací uvedených v dalším textu se zaměřuje právě na studium takových vlastností (zejména imunomodulačních) bifidobakterií, které by mohly objasnit mechanismy jejich působnosti v organismu a vhodným výběrem kmenů napomoci ke stimulaci nebo inhibici tvorby jednotlivých cytokinů odpovědných za určité typy onemocnění.

Perdigon a kol., (2003) testovali podání homologovaného kmene *B. animalis* na imunomodulační odpověď organismu myši. V experimentu byl použit homologovaný kmen *B. animalis* se schopností adheze ke sliznici střeva. Autoři studie zmiňují blahodárny efekt kmenů bifidobakterií v prevenci střevních infekcí. Prospěšné vlastnosti bifidobakterií jsou významně spojeny s dalšími mechanismy jako kompetitivní inhibice, produkce organických kyselin apod. Imunomodulační vlastnosti bifidobakterií studovali López a kol. (2010), kteří otestovali celkem 12 kmenů bifidobakterií náležejících ke čtyřem různým druhům *B. longum*, *B. breve*, *B. bifidum* a *B. animalis*. Imunomodulační vlastnosti sledovali na monocytech odvozených z dendritických buněk a zaměřili se na jejich schopnost produkovat cytokiny po expozici bakteriálními kmeny. Všechny kmeny bifidobakterií vykazovaly schopnost působit na plné dozrání dendritických buněk, ale vykazovaly různou úroveň v produkci cytokinů, zejména IL-10 a IL-12, TNF alfa a IL-1 beta. Specifické poměry cytokinů lze využít k predikci Th imunitní odpovědi, kterou mohou podporovat. Analýza produkce cytokinů mononukleárními

buňkami z periferní krve ukazuje, že většina kmenů *B. animalis* a *B. longum* navodila sekreci velkého množství IFN gama a TNF alfa, což odpovídá Th1 profilu. Práce ukázala druhově i kmenově specifický imunologický efekt bifidobakterií a popsala významnou metodu pro screening imunomodulačních vlastností. Důležité je zjištění, že některé kmeny *B. bifidum* vykazují polarizaci Th17 a tím mohou být užitečné pro další probiotické aplikace.

Konzumace bakterií mléčného kvašení je považována za přínosnou v rozsáhlém spektru imunitních reakcí. Současně se předpokládá, že může u konzumentů zvyšovat rezistenci k infekčním nemocem a zhoubným nádorům. Kmeny *Lactobacillus rhamnosus* (HN001, DR20), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) a *B. lactis* (HN019, DR10) byly testovány z hlediska imunitní odpovědi u zdravých myší (Gill et al., 2000). Suplementace kmeny *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* a *B. lactis* vyústily v významným vzrůstu fagocytové aktivity leukocytů z periferní krve a peritoneálních makrofágů v porovnání s kontrolní skupinou. Slezinné buňky myší po podání kmenů *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* a *B. lactis* produkovaly vyšší množství interferonu- gama, zatímco vliv na interleukin-4, produkovaný slezinnými buňkami, nebyl při konzumaci kmenů bakterií mléčného kvašení zaznamenán. Na základě těchto výsledků autoři studie konstatovali, že podávání výše zmíněných kmenů *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* a *B. lactis* zdravým myším umožňuje navýšit některé ukazatele přirozené i získané imunity.

Stárnutí je proces, kdy dochází ke snižování buněčné imunity. Proto starší lidé mohou profitovat z bezpečného a efektivního zásahu, který pomůže obnovit buněčné imunitní funkce. Gill a kol. (2001) zjistili, že dieta obsahující probiotický kmen *B. lactis* HN019 zvyšovala buněčnou imunitu starších lidí. 30 starších dobrovolníků (průměrný věk 69 let) se zúčastnilo dietního suplementačního pokusu v trvání 9 týdnů. Během pokusu byly sledovány změny v poměrech leukocytů, jejich fagocytózní a další aktivity testováním vzorků periferní krve. Bylo konstatováno, že velké změny byly zaznamenány u subjektů, které měly slabou předchozí imunitní odpověď.

Další pozitivní reakce vlivem působení bifidobakterií byly zaznamenány v další studii - podávání kmene *B. lactis* HN019 skupině padesáti dobrovolníků ve věku 41-81 let (průměr 60 let) po dobu 9 týdnů. Zatímco konzumace nízkotučného mléka neměla významný vliv na imunitní odpověď, konzumace kmene *B. lactis* významně zvýšila fagocytózu PMN buněk a NK buněk (Chiang a kol. 2000).

Gastrointestinální trakt je komplexní, dynamický ekosystém. Komensální mikroorganismy (C), které se pomnoží v trávicím traktu po narození, jsou rozhodující pro homeostázu střev, zatímco nekomensální mikroorganismy (NC) jsou přítomny přechodně, do organismu vstupují z vnějšího prostředí a potravy. Dogi a Perdigon (2006) porovnávali vliv ústního podání C a NC na střevo a s tím spojenou lymfatickou tkáň (GALT) u myší. Aby bylo možno zjistit vliv probiotik na hostitele, byla sledována jejich interakce se střevem pomocí elektronového mikroskopu a fluores-

cenčně značených bakterií. Porovnávali imunomodulační kapacitu C a NC kmenů na základě cytokinového profilu a počtu Ig A+. V počtu buněk IgA+ nebyly zjištěny rozdíly, ačkoliv cytokinové odpovědi C a NC bakteriím byly rozdílné. Pokud se autoři zaměřili na cytokiny (IFN gama a TNF alfa) bylo zjištěno, že TNF alfa byl zejména produkován NC bakteriemi, zatímco C bakterie byly schopny vyvolat produkci IFN gama. Regulační cytokiny IL-10 a IL-4 byly produkovány jak skupinami kmenů C, tak NC. Cytokinový profil ukázal, že C bakterie působí v regulaci homeostázy výrazněji než bakterie NC.

Crohnova nemoc je chronické onemocnění střev, které má vždy období klidu a období vzplanutí. Crohnova nemoc může napadnout kteroukoliv část trávicího traktu od úst až po konečník. Obecnými symptomy bývá abdominální bolest a průjem. Probiotika mají schopnost měnit složení střevní mikroflóry a tím redukovat záněty střev (Butterworth a kol. 2008). Probiotika jsou velmi dobře tolerována a nejsou známy žádné vedlejší účinky.

V léčbě Crohnovy choroby jsou efektivní kortikoidy, přibližně 20% pacientů opětovně onemocní po vysazení této léčby. Pacienti se tak stávají na kortikoidech závislí a přitom kortikoidy mají celou řadu vedlejších účinků. Vysoká úroveň TNF alfa je spojena s rozvojem onemocnění Crohnovou chorobou. Léky, které by blokovaly TNF alfa, by mohly poskytnout alternativu pro pacienty (Akobeng, 2004).

Behm a Bickston (2008) se zabývali studiem blokátorů TNF alfa. TNF alfa je mediátor sekretovaný bílými krvinkami a zvyšuje zánět. Blokátory TNF alfa se spojí s molekulou TNF alfa a tím neutralizují její biologickou aktivitu a výsledkem je hojení střevního zánětu.

Prozánětlivý cytokin TNF alfa je spojován i s rozvojem patogenezi dalších onemocnění jako jsou revmatoidní artritida, psoriáza a ulcerativní kolitida. Zablokováním cytokinu TNF alfa dochází k remisi onemocnění a k obnově střevní sliznice (Lawson a kol. 2006).

Probiotika jsou využívána i pro remisi ulcerativní kolitidy (UC). Pro léčbu UC se stále hledá alternativní léčba. Současné studie spojené s užíváním probiotik neposkytují dostatek důkazů prokazující výrazně jejich pozitivní efekt (Mallon 2007). Z tohoto důvodu je nutné, aby probiotika byla nadále testována a použita ve velké, dobře navržené studii, která by benefity probiotik v léčbě UC i dalších onemocnění mohla prokázat.

## Materiál a metody

Kmeny byly dodány ze Sbírký mlékařských mikroorganismů v lyofilizované formě, následně byly obnoveny do MRS bujónu s přísadkou cysteinu. Kmeny byly 3x přeočkovány, kultivovány za optimálních kultivačních podmínek 37 °C 48 hodin v anaerobním prostředí.

Takto obnovené kmeny byly po kontrole aktivní kyselosti, mikroskopického obrazu a stanovení počtu mikroorganismů použity po další přípravu vzorků ke stanovení cytokinové exprese.

**Tab. 1** Testované kmeny bifidobakterií ze Sbírký mlékařských mikroorganismů Laktoflora®

Pořadové číslo	Sbírkový kmen
1	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 241
2	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 93
3	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> CCDM 372
4	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> CCDM 367
5	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 107
6	<i>Bifidobacterium</i> sp. CCDM 879
7	<i>Bifidobacterium</i> sp. CCDM 775
8	<i>Bifidobacterium</i> sp. CCDM 492
9	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 239
10	<i>Bifidobacterium</i> sp. CCDM 370
11	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> CCDM 369
12	<i>Bifidobacterium dentium</i> CCDM 318
13	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 366
14	<i>Bifidobacterium</i> sp. CCDM 486
15	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> CCDM 219

X- Vivo 10 (Cambrex)

Periferní krev zdravých dárců (transfúzní stanice Praha)

Histopague 1077 (Sigma-Aldrich)

Pokewed mitogen (PWM) (Sigma-Aldrich)

Concanavalin A (ConA) (Sigma-Aldrich)

### Příprava vzorků

Nakultivované kmeny byly 3x odstředěny a promyty fyziologickým roztokem a doplněny na 5 ml tkáňovým živným roztokem X - Vivo. Tímto způsobem byla připravena skupina vzorků s vyšší denzitou. Po zředěním 100x byla připravena skupina vzorků s nižší denzitou.

Promyté a zchlazené kmeny byly dále použity ke směsné kultivaci s mononukleárními buňkami. Předtím byly odebrány vzorky ke stanovení počtů mikroorganismů a mikroskopie.

**Tab. 3** Vliv kmenů bifidobakterií na produkci cytokinů (pg/ml)

Vzorek/cytokin	IFN gama	IL-17	IL-1 alfa	IL-1 beta	IL-4	IL-5	IL-6	IL-10	MCP-1	Rantes	TNF alfa	VEGF	Eotaxin	IL-12	IL-13	IP-10	Leptin
Stimulace buněk PWM <sup>n)</sup>	618,08	50,59	224	493,71	9,2	455,73	>3600	118,27	>2100	>2400	2470,72	15,44	5,41	8,08	66,77	118,53	0
Stimulace buněk PWM+A <sup>xx)</sup>	165,88	65,59	88,4	397,62	4,33	275,47	615,43	30,85	525,37	>2400	507,29	11,56	29,42	62,09	2218,82	339,3	174,22
1	11,83	0,54	49,6	292,93	1,55	0	1544,44	10,65	584,79	751,38	16,04	33,84	0	0	3,01	0	16,56
2	4,58	0,54	29,75	172,53	1,55	0	1932,06	10,51	727,12	1142,49	11,42	29,67	5,41	8,08	2,06	1,76	0
3	2,58	0,48	32,73	46,02	1,55	0	344,36	4,41	1281,59	1496,96	8,95	13,19	0	8,08	0	0	16,56
4	3,68	0,9	63,05	107,51	2,01	0	1090,29	10,57	276,53	695,73	99,56	9,18	0	8,08	0	0	0
5	1,72	0,8	92,52	597,73	1,88	0,37	2519,68	23,34	198,31	1541,15	718,58	12,7	0	8,08	7,23	1,76	0
6	0,65	0,48	37,77	246,63	2,21	0	1986,74	28,016	893,15	373,91	816,21	11,16	0	0	0	1,76	0
7	2,82	0	18,31	71,09	0	0	841,33	5,03	74,54	1241,24	117,19	12,08	0	8,08	0	1,76	0
8	16,94	0	25,41	48,69	1,55	0	3617,96	13,71	>2100	713,33	22,62	23,96	5,41	8,08	5,05	1,76	16,56
9	22,47	0,8	37,59	68,32	0	0	>3600	20,17	>2100	960,3	28,26	28,55	0	0	0	0	0
10	22,96	0,54	64,12	108,89	1,55	0	>3600	27,68	>2100	>2400	52,15	45,28	0	0	0	0	0
11	6,49	0	58,12	23,19	1,55	0	2132,84	6,3	>2100	776,38	39,31	40,41	0	4,21	0	1,76	0
12	9,01	0	22,16	43,09	0	0	3205,86	8,35	>2100	556,82	36	21	5,41	0	0	0	0
13	10,07	0	12,75	22,26	0	0	1764,82	4,15	>2100	336,2	18,09	15,92	16,19	37,16	16,91	16,67	130,04
14	0	0	0	1,81	0	0	3,62	0	168,52	581,69	0,21	18,82	0	8,08	0	0	16,56
15	151,11	2,28	51,14	446,03	0	3,44	1351,48	4,29	827,41	1221,62	20,92	27,7	0	8,08	0	0	0
Nestimulované buňky 16	18,90	0,28	39,19	283,31	0	0,37	759,29	1,36	189,33	796,67	14,97	15,68	0	0	0	0	0

n=2; <sup>n)</sup> Pokewed mitogen; <sup>xx)</sup> Pokewed mitogen a Concanavalin A**Tab. 2** Stanovení aktivní kyselosti a počtu bifidobakterií v připravených vzorcích

Pořadí testovaného kmene	Aktivní kyselost pH	KTJ (vyšší denzita)	KTJ (nižší denzita)
1	4,32	1,1.10 <sup>9</sup>	3,2.10 <sup>7</sup>
2	4,32	4,4.10 <sup>9</sup>	1,8.10 <sup>7</sup>
3	4,30	3,8.10 <sup>9</sup>	2,4.10 <sup>7</sup>
4	4,27	4,1.10 <sup>9</sup>	3,3.10 <sup>7</sup>
5	4,31	3,1.10 <sup>9</sup>	1,0.10 <sup>7</sup>
6	4,32	6,4.10 <sup>8</sup>	6,2.10 <sup>6</sup>
7	4,29	1,6.10 <sup>9</sup>	9,6.10 <sup>6</sup>
8	4,28	5,1.10 <sup>9</sup>	3,3.10 <sup>7</sup>
9	4,32	2,5.10 <sup>9</sup>	1,8.10 <sup>7</sup>
10	4,31	8,0.10 <sup>9</sup>	5,7.10 <sup>7</sup>
11	4,28	3,1.10 <sup>9</sup>	2,6.10 <sup>7</sup>
12	4,27	7,4.10 <sup>9</sup>	4,5.10 <sup>7</sup>
13	4,24	2,0.10 <sup>9</sup>	9,4.10 <sup>6</sup>
14	4,23	3,4.10 <sup>9</sup>	2,2.10 <sup>7</sup>
15	4,23	4,0.10 <sup>9</sup>	1,8.10 <sup>7</sup>

Mikroskopický obraz: krátké granulované tyčinky

Následně byly ze dvou různých buffy coatů dobrovolných zdravých dárců separovány mononukleární buňky. Buffy coat byl izolován z plně nesrážlivé krve zdravých dárců centrifugací při 200 g. Sediment obsahující buněčnou frakci krve jsme získali z ÚHKT. Takto získaný buffy coat jsme naředili ana partes tkáňovým médiem X-Vivo (Cambrex), a opatrně navrstvili na roztok Histopague 1077 (Sigma- Aldrich). Gradientovou centrifugací při 600 g (Boyum, 1968) jsme získali vrstvu bílého prstence, který obsahoval mononukleární buňky.

Takto získané mononukleární buňky byly pro další práci naředěny na koncentraci  $10^6$  buněk/ml kultivačním X - Vivo médiem.

Mononukleární buňky separované z buffy coatu ( $10^6$  buněk/ml) byly stimulovány mitogeny (Pokeweed mitogen, Concanavalin A) a bakteriemi při 37 °C a 5% CO<sub>2</sub> v atmosféře po dobu 3 dny.

Vyšší koncentrace bakterií reagovala s krevními buňkami velmi intenzivně, ředící X - Vivo médium bylo vzápětí po aplikaci odbarvováno, a proto následné testy byly provedeny s nižší koncentrací bakteriálních buněk.

### Stanovení cytokinů:

Stanovení cytokinů bylo provedeno multiplexovou metodou LUMINEX, kterou byly kvantifikovány cytokiny ve vzorcích supernatantů.

### Princip metody:

Kvantitativní multiplexová analýza pomocí značených mikropartikulí.

Každá mikropartikule je barevně označena použitím specifických poměrů dvou fluorescenčních barev.

Na každé mikropartikuli je navázána specifická protilátka proti cytokinu.

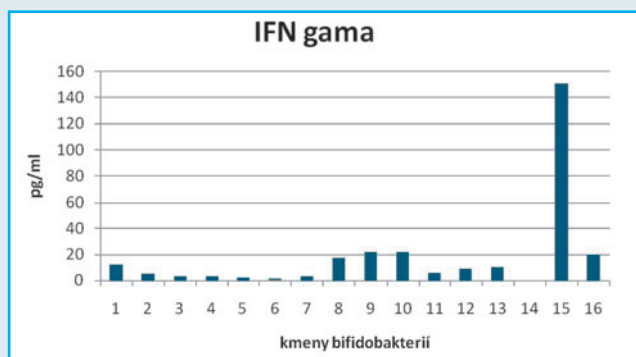
Značené a navázané mikropartikule jsou analyzovány v Luminex 100 analyzátoru.

Získané výsledky jsou v pg/ml.

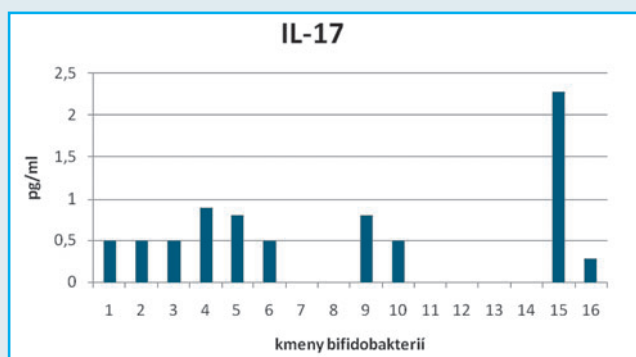
## Výsledky

Výsledky vlivu kmenů bifidobakterií na produkci cytokinů (pg/ml) jsou uvedeny v tabulce 3.

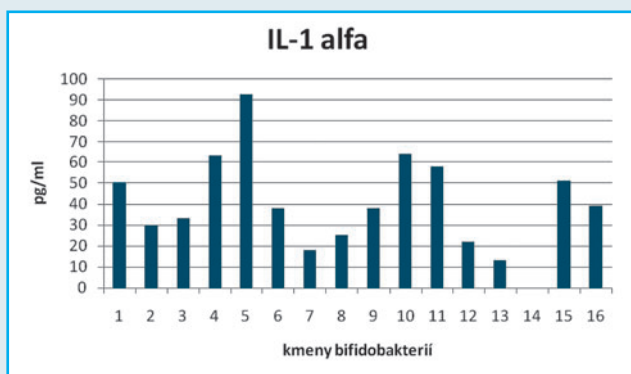
Graf č. 1



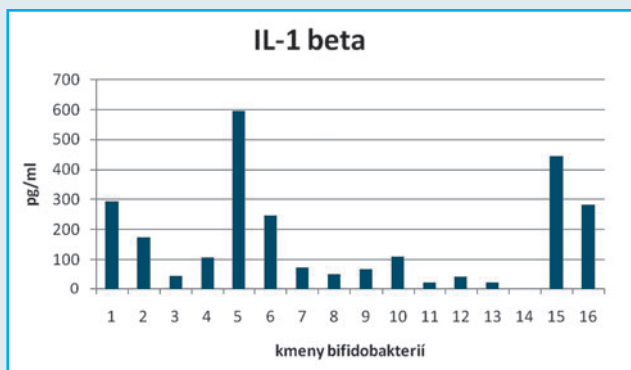
Graf č. 2



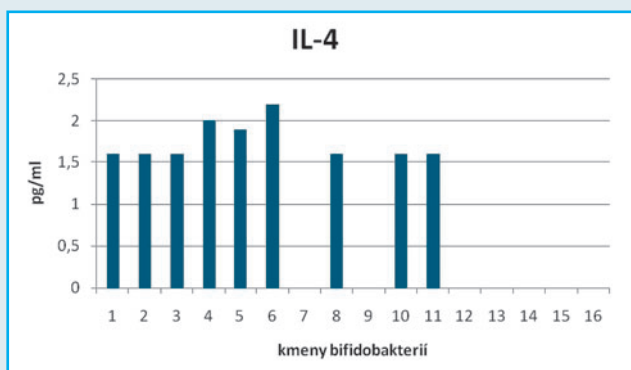
Graf č. 3



Graf č. 4



Graf č. 5



## Diskuze výsledků

**z hlediska fyziologické funkce jednotlivých cytokinů a jejich tvorby po stimulaci vybranými bakteriemi**

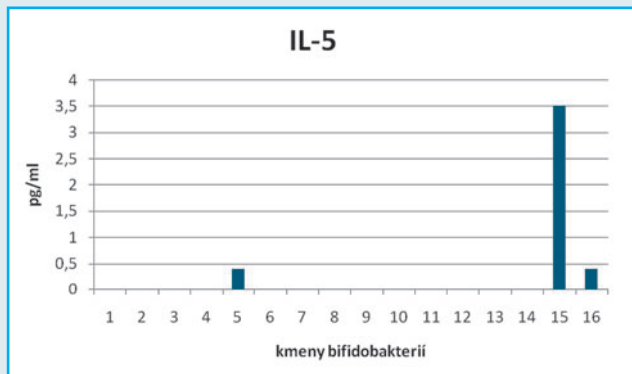
Cytokiny jsou specificky působící regulátory s pozitivním nebo negativním účinkem na řadu fyziologických procesů (Hořejší, Bartůňková, 2005).

Tvorbu cytokinů stimulovanou jednotlivými kmeny jsme porovnávali s tvorbou cytokinů pouze krevními mononukleárními buňkami samotnými a dále pak se stimulací cytokinů indukovanou samotnými mitogeny ke stimulaci lymfocytů - pokeweed mitogenu (PWM) a concanavalinu A.

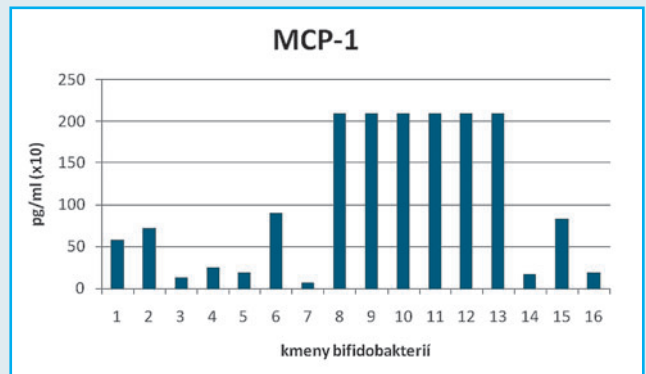
Interferon gama (IFN<sub>gama</sub>) je nazývaný též imunitní. IFN<sub>gama</sub> je typickým představitelem TH1 klonů lymfocytů. I když v nestimulované kultuře (graf č. 1) byly výsledky tvorby IFN gama vysoké, podíváme-li se na graf IFN gama a IL- 4 (graf č.5), je vidět, jak se doplňují ve



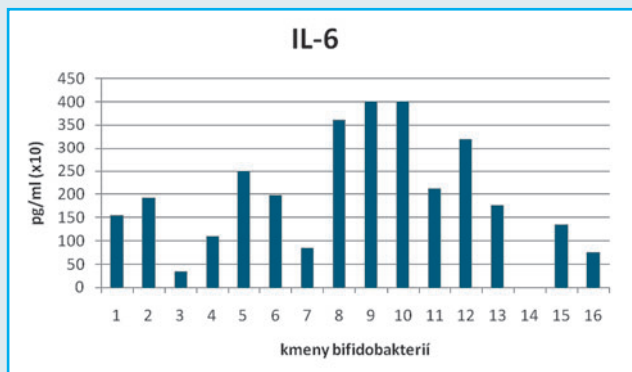
Graf č. 6



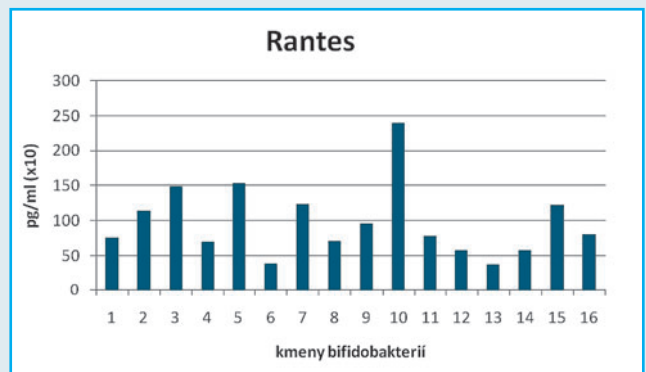
Graf č. 9



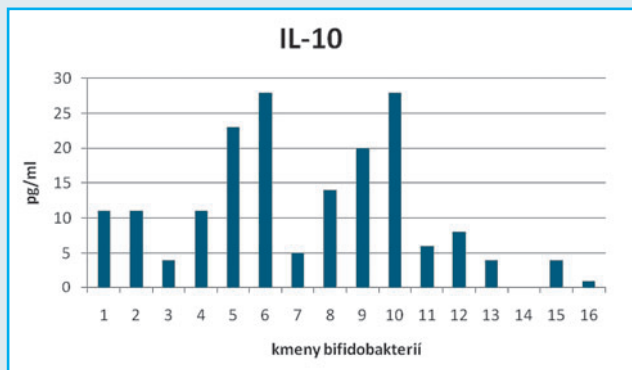
Graf č. 7



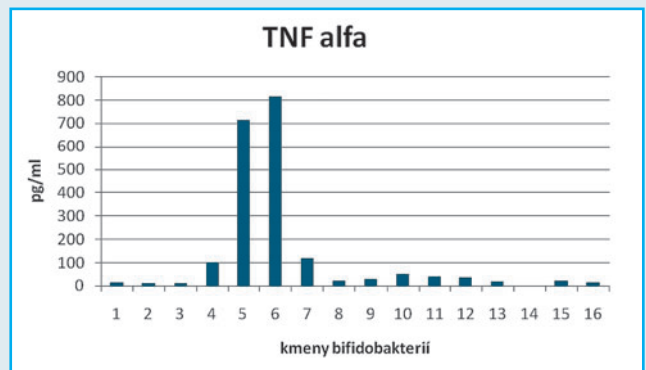
Graf č. 10



Graf č. 8



Graf č. 11



funkci. Z kmenů námi sledovaných vykázal nejvyšší hodnotu kmen č. 15. Dosáhl hodnoty 151,11 pg/ml, tj. o 132,21 pg/ml více než mononukleární buňky bez stimulační.

Interleukin-17 (IL-17) je cytokin, který působí jako mediátor opožděné reakce zvyšováním produkce chemokínů v různých tkáních posunem monocytů a neutrofilů směrem k zánětu. Vzhledem ke své účasti v autoimunitních onemocněních, blokátory IL-17 jsou testovány jako možný způsob léčby např. revmatoidní artritida a zánětlivá onemocnění střev. Patří do skupiny prozánětlivých cytokinů a synergicky působí s TNF a IL-1. Hodnota nestimulovaných buněk vykázala hodnotu 0,28 pg/ml, nejvyšší dosažená hodnota byla naměřena u kmenu č. 15 2,28 pg/ml, tj. o 48,31 pg/ml nižší než byly zjištěné hodnoty u buněk stimulovaných PWM.

Interleukin-1 (IL-1) je funkčně řazen mezi prozánětlivé cytokiny. Interleukin-1 alfa (IL-1 $\alpha$ ) je cytokin se širokým

spektrům metabolických, fyziologických, krvetvorných aktivit a hraje důležitou roli v regulaci imunitních odpovědí. IL-1 $\alpha$  je aktivován makrofágy a neutrofilů, epiteliálními a endoteliálními buňkami. Je odpovědný za zánět a podporuje horečku. Testované kmeny vykazovaly hodnoty v rozmezí produkce nestimulovaných buněk a indukované stimulační s regulátorem. Pouze u kmene č. 14 byla zaznamenána hodnota 0.

Interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) je znám jako catabolin. Celá řada studií spojuje jeho výskyt se schizofrenií, současně ale hraje úlohu v rozvoji celé řady autoimunitních onemocnění, je významným aktivátorem resorpce kostí. Hodnoty produkce tohoto interleukinu nedosahují výše nestimulovaných buněk, s výjimkou kmenu č. 5.

Interleukin-4 (IL-4) je cytokin indukující diferenciaci T buněk na Th2 buňky. Zjištěné hodnoty sledovaných kmenů nebyly výrazně odlišné od nestimulovaných buněk.

Interleukin 5 (IL-5) je cytokin produkovaný Th2 buňkami a tukovými buňkami. Jeho funkce stimuluje B buňky v růstu a zvyšuje sekreci imunoglobulinu. Vyšší hodnota oproti nestimulovaným buňkám byla zjištěna pouze kmenu č. 15.

Interleukin-6 (IL-6) je cytokin s pro a protizánětlivým účinkem. Je sekretován T buňkami a makrofágy, stimuluje imunitní odpověď v průběhu infekcí a po traumatech jako jsou popáleniny nebo poškození tkáně zánětem. U kmenů č. 9,10 byly zjištěny vyšší hodnoty na úrovni PWM, ostatní kmeny vykazovaly hodnoty nižší.

Interleukin-10 (IL-10) je regulační protizánětlivý cytokin inhibující sekreci IL-1, IL-2, IL-12 a INF gama. Inhibuje Th1 lymfocyty, aktivuje B lymfocyty a TH2. Naměřené hodnoty pro IL-10 byly mimo kmen č. 14 vyšší než nestimulované buňky. Nejvyšší zjištěná hodnota byla u kmene č. 6 - 28,16 pg/ml.

MCP1 je nacházen u lidí s revmatoidní artritidou, kde může být na příčině zánětů kloubů aktivací makrofágů. MCP1 byl nalezen ve zvýšené míře v moči lidí se sklonem k zánětlivému onemocnění ledvin. Kmeny č. 7, 14 dosáhly nižších hodnot než nestimulované buňky, ostatní kmeny vykazovaly hodnoty vyšší než nestimulované mononukleární buňky nebo i rovné indukované stimulaci.

RANTES - zkr. druh chemokinů. Produkován T lymfocyty, destičkami, některými epiteliálními a nádorovými buňkami. Patří k CC chemokinům, má prozánětlivé účinky. Kmeny bifidobakterií č. 1, 4, 6, 8, 11, 12, 13, 14 vykazovaly nižší hodnoty než buňky nestimulované. Zbývající kmeny mimo č. 10 vykazovaly hodnoty nižší než stimulované PWM a PWM +conA.

TNF je cytokin rozvíjející zánět a patří do skupiny cytokinů, které stimulují akutní fázi reakce. Je produkován makrofágy, ale i jinými typy buněk. Podporuje zánětlivou odpověď a je spojován s autoimunitními onemocněními, jako je revmatoidní artritida, zánět střev, psoriáza a astma. Kmeny bifidobakterií stimulovaly produkci TNF ve velké většině pouze nepatrně, kmen č. 14 dosáhl hodnoty pouze 0,21 pg/ml to je o 3,19 pg/ml nižší než je hodnota nestimulovaných krevních buněk. Kmen s nejvyšší hodnotou 816,21 pg/ml, vykázal tuto hodnotu, která je o 1654,51 pg/ml nižší než hodnota naměřená u krevních buněk stimulovaných PWM.

VEGF (vaskulární endoteliální růstový faktor) In vitro je VEGF endoteliálním buněčným mitogenem. In vivo navozuje angiogenezi a zvyšuje mikrocévní permeabilitu. Podporuje extravazaci plazmového fibrinogenu, vedoucímu k ukládání fibrinu. Na základě in vitro a in vivo vlastností se předpokládá, že VEGF hraje významnou roli v zánětu a během normální i patologické angiogeneze. Vliv sledovaných kmenů na VEGF nebyl zaznamenán. Naměřené hodnoty jsou u všech kmenů vyrovnané s hodnotami buněk bez stimulace, ale i se stimulací.

Eotaxin- působí na Th2 lymfocyty, tukové buňky i na buňky kostní dřevě, a na různých úrovních se tak zásadním způsobem podílí na rozvoji alergických reakcí. Eotaxin přispívá k migraci antigen-specifických T lymfocytů do ohniska zánětu a k jejich udržení v něm. Všeobecně se

předpokládá, že právě T lymfocyty prostřednictvím cytokinů, které uvolňují do okolí (IL-3, IL-4, IL-5, GM-CSF), řídí rozvoj zánětu. Spektrum cytokinů ukazuje, že jde převážně o Th2 lymfocyty. IL-4 má řadu biologických aktivit, významných pro alergickou reakci: patří mezi ně především tvorba IgE a (spolu s komplexem IgE+alergen) následná aktivace žírných buněk. Eotaxin, působící komplementárně a synergicky s IL-5, je považován za klíčový regulátor alergických reakcí, a z hlediska jejich léčby za mimořádně perspektivní. Kmen bifidobakterií č. 13 měl významně vyšší hodnotu než nestimulované buňky.

Interleukin 12 (IL-12) je interleukin, který je přirozeně produkován dendritickými buňkami, makrofágy a lidskými B-lymfoblastovými buňkami (NC-37) jako odpověď na antigenní podnět. IL-12 je zapojen do diferenciací T buněk v buňky Th 0, které se dále vyvíjejí do buněk Th1 nebo Th2.

IP-10 je chemokin indukovaný v různých buňkách jako odpověď na IFN gama a lipopolysacharidy.

IL-13 je interleukin sekretovaný celou řadou buněk zejména Th 2, které jsou mediátory alergických zánětů a onemocnění. Dále má vliv na imunitní buňky stejně jako spřízněný cytokin IL-4.

Námi testované kmeny nestimulovaly produkci IL-12, IL-13, IP-10, hodnoty byly nízké nebo 0.

Leptin plní v organismu početné funkce. Podílí se na udržování energetické homeostázy. Podílí se také na regulaci kardiovaskulárních (aktivace sympatiku, zvyšování krevního tlaku, indukce angiogeneze) a imunitních funkcí, na řízení ontogeneze. Testované kmeny neprojevovaly vliv na produkci leptinu, významně vyšší hodnotu jsme zaznamenali pouze u kmene č. 13.

## Závěr

V této práci bylo otestováno 15 kmenů bifidobakterií z hlediska jejich imunomodulačních charakteristik. Byla sledována jejich schopnost stimulovat cytokiny s pro i protizánětlivým účinkem, cytokiny regulující humorální a buněčnou imunitu.

Kmeny bifidobakterií působí na krevní mononukleární buňky a stimuluje jednotlivé cytokiny zcela specifickým způsobem, který se významně liší kmen od kmene. Specifické poměry cytokinů lze využít k predikci Th imunitní odpovědi, které mohou podporovat. Na základě této znalosti je možno vybírat kmeny dle jejich specifík a cíleně je nasazovat v prevenci některých onemocnění popř. i v léčbě. Výzkum tohoto druhu je zatím na počátku a získané výsledky jsou příspěvkem v této méně prozkoumané oblasti.

*Tato práce vznikla za podpory Rozhodnutí R0511.*

## Literatura

- AKOBENG AK, ZACHOS M. (2004): Tumor necrosis factor-alpha antibody for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, Issue 1. Art. No. CD003574. DOI: 10.1002/14651858. CD003574.pub2.

- BEHM BW., BICKSTON SJ. (2008): Tumor necrosis factor- $\alpha$  antipody for maintenance of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, Issue 1. Art. No. CD006893. DOI: 10.1002/14651858. CD006893.
- BOYUM A. (1968): Isolation of leucocytes from human blood. Further observations. Methylcellulose, dextran and ficoll as erythrocyte aggregating agents. *Scand J Clin Lab Invest*, Suppl., 97, s. 37-50.
- BUTTERWORTH AD., THOMAS AG., AKOBENG AK. (2008): Probiotics for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, Issue 3. Art. No. CD006634. DOI: 10.1002/14651858. CD006634.pub2 (ISSN 1464-780X).
- CHIANG BL., SHEIH YH., WANG LH., LIAO CK., GILL HS. (2000): Enhancing immunity by dietary consumption of a probiotic lactic acid bacterium (*Bifidobacterium lactis* HN019): optimization and definition of cellular immune responses. *Eur J Clin Nutr*, Nov; 54, (11), s. 849-55.
- DOGI CA, PERDIGÓN G. (2006): Importance of the host specificity in the selection of probiotic bacteria. *J. Dairy Res*, Aug; 73, (3), s. 357-66. Epub 2006 Jul 13.
- FEYSETAN O., TRACEY C., HELLAWEEL G. (2012): Probiotics, dendritic cells and bladder cancer. *BJU Int*. Jun, 109, (11) s. 1594-7.
- GILL HS., RUTHERFURD KJ., PRASAD J., GOPAL RK. (2000): Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019). *Brit. J Nutr*; 83, (2), s. 167-76.
- GILL HS., RUTHERFURD KJ., CROSS ML., GOPAL RK. (2001): Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HN019. *Amer. J. Clin Nutr*, Dec; 74, (6), s. 833-9.
- HOŘEJŠÍ V., BARTUŇKOVÁ J. (2005): *Základy imunologie*. Nakl. Triton, 3. Vydání, 280 str.
- KURMANN J., ROBINSON R. (1991): *The health potential of products containing bifidobacteria. The therapeutic properties of fermented milks* (pp. 17-157). ISBN 1-85166-552.
- LAWSON MM., THOMAS AG., AKOBENG AK. (2006): Tumor necrosis factor  $\alpha$  blocking agents for induction of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, Issue 3. Art. No.: CD005112. DOI: 10.1002/14651858. CD005112.pub2.
- LEBLANC J. a KOL. (2011): B-group vitamin production by lactic acid bacteria- current knowledge and potential applications. *J. Appl. Microbiol.*, Dec. 111, (6), 1297-309.
- LÓPEZ P., GUEIMONDE M., MARGOLLES A., SUÁREZ A. (2010): Distinct *Bifidobacterium* strains drive different immune responses in vitro. *Int J Food Microbiol.*, Mar, 31, 138, (1-2), s. 157-65. Epub 2010 Jan 4.
- MALLON PT., MCKAY D., KIRK SJ., GARDINER K. (2007): Probiotics for induction of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, Issue 4. Art. No.: CD005573. DOI: 10.1002/14651858. CD005573.pub2.
- O FLAHERTY S. A KOL. (2010): How can probiotics and prebiotics impact mucosal immunity? *Gut Microbes*, Sep, 1, (5), s. 293-300.
- PATEL R., LIN P. (2010): Developmental biology of gut-probiotic interaction. *Gut Microbes*, May-Jun, 1 (3), s. 186-95.
- PERDIGÓN G., LOCASCIO M., MEDICI M., PESCE DE RUIZ HOLGADO A., OLIVER G. (2003): Interaction of bifidobacteria with the gut and their influence in the immune function. *Biocell*, Apr; 27, (1), s. 1-9.
- VENTURA, M., VAN SINDEREN, D., FITZGERALD, G.F., ZINK, R. (2004): Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 86, s. 205-223.

Přijato do tisku 30. 4. 2012

Lektorováno 27. 5. 2012

## NOVÁ KNIHA

Pavel Kadlec, Karel Melzoch, Michal Voldřich a kol.:

### **Technologie potravin - Procesy a zařízení potravinářských a biotechnologických výroby**

Nakladatelství KEY Publishing s.r.o. Ostrava, ISBN 978-80-7418-086-6, 2012, 1. vydání, formát B5, 494 stran

V květnu 2012 se objevila na knižním trhu nová kniha **Procesy a zařízení potravinářských a biotechnologických výroby**, kterou vydalo nakladatelství KEY Publishing pro Fakultu potravinářské a biochemické technologie Vysoké školy chemicko-technologické v Praze. Kniha je určena všem zájemcům o odborné znalosti související s inženýrskými procesy při výrobě potravin a měla by sloužit nejen jako učebnice pro studenty potravinářského a příbuzného zaměření všech stupňů, ale také jako zdroj základních informací pro odbornou veřejnost a pracovníky v potravinářství.

V úvodu knihy se uvádí:

*Cílem každé průmyslové i dílenské výroby je vyrobit za minimálních investičních a provozních nákladů široký sortiment kvalitních a dobře prodejných výrobků, vyprodukovat maximální zisk a minimalizovat negativní dopad na životní prostředí. Při výrobě potravin je prioritní zajistit, vedle výše uvedených obecných zásad, zdravotní nezávadnost potravin s prodlouženou trvanlivostí a s minimálními změnami sensorických a nutričních vlastností. Nabídka vyráběného sortimentu potravin se musí vyznačovat atraktivní chutí, barvou, vůní, texturou i lákavým a funkčním obalem. Pro řadu potravin je důležité prodloužit období,*

