

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Vliv fenolových sloučenin na adherenci mikroorganismů
v modelu střevního epitelu**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Denisa Binderová

Obor studia: Výživa a potraviny

Vedoucí práce: Ing. Ivo Doskočil, Ph.D.

Konzultant: Ing. Veronika Jarošová

© 2018 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv fenolových sloučenin na adherenci mikroorganismů v modelu střevního epitelu" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 11. 4. 2018

Poděkování

Ráda bych touto cestou moc poděkovala mému vedoucímu práce Ing. Ivo Doskočilovi, Ph.D. a mé konzultantce Ing. Veronice Jarošové za všechny čas, který mi věnovali, za ochotu a cenné rady a také za trpělivost a veškerou odbornou pomoc při psaní této práce.

Vliv fenolových sloučenin na adhezenci mikroorganismů v modelu střevního epitelu

Souhrn

Ovoce a zelenina jsou nedílnou součástí lidského jídelníčku, kdy poskytují řadu biologicky aktivních sloučenin, mezi které patří fenolové sloučeniny. Tyto fenolové sloučeniny hrají roli v antioxidační ochraně před volnými radikály, čímž přispívají k prevenci před řadou onemocnění. Jejich biologická dostupnost je ovlivňována střevním mikrobiomem, mezi který patří probiotické kmeny *Lactobacillus* spp. a *Bifidobacterium* spp.

Pro hostitele mají probiotika nenahraditelný význam v ochraně organismu před patogeny, zabraňují poškození střevní sliznice a hrají roli v imunitním systému. Pro jejich účinnost je důležitá jejich schopnost adhezovat na střevní sliznici. Adherence probiotik je ovlivňována průchodem gastrointestinálním traktem, kde hraje roli pH a žlučové kyseliny. Zároveň ji mohou ovlivňovat fenolové sloučeniny v potravě.

Pomocí *in vitro* modelu gastrointestinálního traktu na vybrané kmeny *Lactobacillus brevis* a *Lactobacillus gasseri* bylo simulováno jejich trávení a následně společně s resveratrolem (4,5; 2,25 a 1,125 $\mu\text{g/ml}$) byly testovány na schopnost adhezovat na buněčný model tlustého střeva, složený z Caco-2 a HT29-MTX buněk.

Simulace trávení snížila životaschopnost *L. brevis* na 12,76 %, respektive na 14,76 % u *L. gasseri*. Zároveň byla u *L. gasseri* zaznamenána nejvyšší adherence a to 28 % při koncentraci resveratrolu 2,25 $\mu\text{g/ml}$, která byla o 10 % vyšší než adherence bez resveratrolu. Ostatní koncentrace naopak adhezenci snižovaly o 2 %, respektive o 8 % při koncentraci 1,125, respektive 4,5 $\mu\text{g/ml}$. Naopak *L. brevis* ani v jedné testované koncentraci neadheroval o více než 1,1 %. Dosažené výsledky jsou však statisticky neprůkazné ($p < 0,05$), což může být zapříčiněno zvoleným buněčným modelem.

Průchod trávicím traktem výrazně snižuje životaschopnost konzumovaných probiotik a zároveň konzumované fenolové sloučeniny nemusí mít vždy pozitivní efekt na adhezi na střevní epitel.

Klíčová slova: probiotika, model střevního epitelu, model trávicí soustavy, trávicí soustava člověka, fenolové sloučeniny

The effect of phenolic compounds on the adherence of microorganisms in the epithelial model

Summary

Fruit and vegetables are important part of the human diet, providing a range of biologically active compounds include phenolic compounds. These phenolic compounds have effect in the antioxidant protection and thereby helping to prevent many diseases. Their bioavailability is effected by the intestinal microbe, which includes probiotic strains of *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp.

Probiotics have irreplaceable importance for host in protecting the organism against pathogens, preventing damage of intestinal mucosa and are important for the immune system. The ability of probiotics to adhere to the intestinal mucosa is important for their effectiveness. Adhesion of probiotics is influenced by the passage through the gastrointestinal tract with different pH and bile acids. Equally phenolic compounds may influence adhesion in the diet.

Selected strains of *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus gasseri* were digested by *in vitro* model of the gastrointestinal tract and then these strains were tested for adhesion to a colon cell model composed of Caco-2 and HT29-MTX cells together with resveratrol (4.5; 2.25 and 1.125 $\mu\text{g} / \text{ml}$).

Simulation of digestion reduced the viability of *L. brevis* to 12.76% and 14.76% for *L. gasseri*. Concurrently, the highest adhesion was observed for *L. gasseri*, 28% at a resveratrol concentration of 2.25 $\mu\text{g} / \text{ml}$, which was 10% higher than adherence without resveratrol. Other concentrations, on the contrary, decreased by 2% respectively 8%, in concentration of 1.125 respectively 4.5 $\mu\text{g} / \text{ml}$, respectively. Conversely *L. brevis* did not adhere to more than 1.1% even at one concentration. However, the results are statistically inconclusive ($p < 0.05$), which may be due to the chosen cellular model.

The passage through the digestive tract significantly reduces the life of the consumed probiotics and the consumed phenolic compounds may not always have a positive effect on adherence to the intestinal epithelium.

Keywords: probiotics, intestinal epithelium model, digestive system model, human digestive system, phenolic compounds

Obsah

1 Úvod	2
2 Cíl práce	3
3 Literární rešerše	4
3.1 Trávicí soustava člověka	4
3.1.1 Stavba a funkce	4
3.2 Mikrobiom trávicího traktu člověka	7
3.2.1 Symbiotické bakterie.....	9
3.2.2 Patogenní bakterie	12
3.2.3 Probiotika, prebiotika a synbiotika	13
3.3 In vitro modely trávicí soustavy	17
3.4 In vitro modely střevního epitelu	19
3.5 Fenolové sloučeniny	22
3.5.1 Resveratrol.....	26
4 Materiály a metody	29
4.1 Materiál	29
4.2 Metodika	29
4.2.1 Příprava bakteriální suspenze	29
4.2.2 In vitro trávení	30
4.2.2.1 Příprava roztoků trávicích šťáv.....	30
4.2.2.2 In vitro trávení	30
4.2.2.3 Měření životaschopnosti laktobacilů pomocí fluorescence.....	30
4.2.3 Test adherence	31
4.2.3.1 Kultivace tkáně	31
4.2.3.2 Založení 24-jamkové destičky	31
4.2.3.3 Příprava resveratrolu	32
4.2.3.4 Test adherence	32
4.3 Statistické vyhodnocení	32
5 Výsledky	33
5.1 In vitro trávení	33
5.2 Adherence	34
6 Diskuze	35
7 Závěr	41
8 Seznam použité literatury	42

1 Úvod

Lidský gastrointestinální trakt vytváří prostředí pro velkého množství mikroorganismů. Mimořádně komplikovaný mikrobiom je funkčně stabilní a přesto jeho složení je rozmanité a může se měnit. Podílí se na získávání energie, zachování funkčnosti prostředí, obraně proti patogenům či na imunologických reakcích. V důsledku toho je fyziologie člověka závislá na interakci s tímto mikrobiomem (Minekus et al., 2014). Dysbióza střevního ekosystému vede k rozvoji některých onemocnění, od infekčních průjmů a průjmů způsobených antibiotiky, až po chronické neurologické poruchy a mnoho dalších. Tato onemocnění mohou být napravena příznivými účinky probiotik. Probiotické kmeny zabraňují či zlepšují příznaky tím, že mění složení střevního mikrobiomu a vedou k produkci metabolitů, které ovlivňují zdraví (Patel et Dupont, 2015).

Jedním z kritérií pro výběr probiotických kmenů je rezistence bakterií především vůči trávení v kyselém prostředí žaludku a ve střevě. Je tedy i důležitá schopnost bakterií přežít působení žlučových solí a tato schopnost je obecně zahrnuta mezi kritéria používaná k výběru potenciálních probiotických kmenů (Yadav et al., 2017). Další z vlastností důležitou proto, aby probiotika přežila a mohla tak působit, je jejich adherence k epiteliálním buňkám tlustého střeva. Tato schopnost je do značné míry specifická pro daný druh a výběr lidských bakteriálních izolátů tak zvýší možnost nalezení organismů, které nejlépe přežijí (Sarao et Arora, 2017).

Jelikož způsob stravování je hlavním faktorem určujícím složení a vývoj střevního mikrobiomu, vedle hlavních živin (sacharidů, bílkovin a tuků) je zde velké množství sloučenin, které mohou mít jak prospěšný, tak nepříznivý účinek na lidské zdraví. Fenolové sloučeniny jsou různorodou skupinou sekundárních metabolitů v rostlinách a mohou hrát důležitou roli v prevenci mnoha onemocnění. Odhaduje se, že 90-95 % přijatých fenolových sloučenin se hromadí v tlustém střevě, kde mohou selektivně potlačovat nebo naopak stimulovat růst některých bakterií a mohou tak ovlivnit dynamiku bakteriální populace (Cueva et al., 2010). *In vitro* modely lidského trávicího traktu umožňují vědcům dohled nad specifickými podmínkami pro podrobnější zkoumání konkrétních parametrů (Deepika et Charalampopoulos, 2010).

2 Cíl práce

Na střevní mikroflóru mají výrazný vliv doplňky stravy ze skupiny probiotik. Nejvíce komerčně využívané mikroorganismy do probiotik jsou členové rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, které jsou vybírány mimo jiné na základě schopnosti přežití při průchodu trávicím traktem nebo schopnosti adherence na střevní epitelální buňky. Cílem diplomové práce je v teoretické části zpracování literární rešerše zaměřené zejména na probiotika, fenolové sloučeniny a *in vitro* modely trávicí soustavy. Cílem praktické části bude nalezení vhodných kmenů laktobacilů, které prokážou dobrou schopnost přežít průchod trávicím traktem, zachovají si adhezenční vlastnosti a budou mít schopnost na základě konkurence o vazebná místa snižovat počty adherujících patogenů.

Hypotéza: Přítomnost vybraných dietárních fenolových sloučenin zvyšuje adherenci určitého perspektivního probiotického kmene a zároveň snižuje adherenci potenciálního patogenu.

3 Literární rešerše

3.1 Trávicí soustava člověka

3.1.1 Stavba a funkce

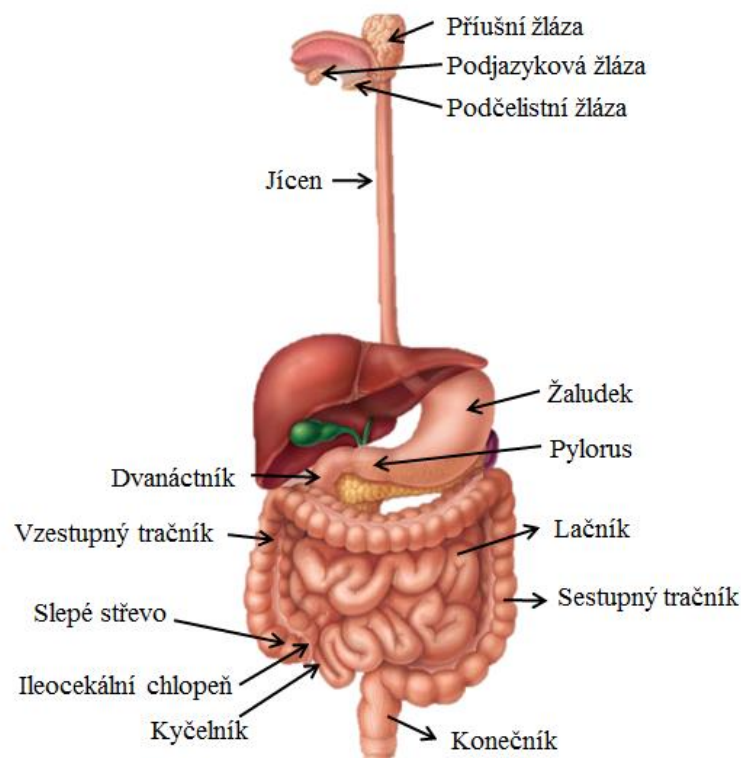
Primární funkcí jednotlivých částí gastrointestinálního traktu je trávení, absorpce, vylučování a ochrana vnitřního prostředí. Tyto funkce zajišťuje řada orgánů s rozdílnými úlohami od úst až po konečník. Žaludek a tenké střevo jsou zodpovědné hlavně za trávení a absorpci, proces zahrnující fyzikální (retropulze) a chemické mechanismy (žluč a enzymy). V tlustém střevě pak především dochází k vysušení a zhutnění odpadu, který je před vyloučením uložen v esovité kličce a konečníku (Cheng et al., 2010).

Gastrointestinální trakt (Obr. 1) začíná dutinou ústní, kde se rozkládají velké kusy potravy a pomocí slin vylučovaných třemi páry slinných žláz (příušní, podčelistní a podjazyková) jsou lépe polykány. Zároveň sliny rozpouštějí některé z molekul potravy, které mohou reagovat s chemoreceptory v ústech a vedou tak ke vzniku chuti. Sliny obsahují některé elektrolyty, hlen pro lepší průchod potravy, antibakteriální sloučeniny, jako je thiokyanát a peroxid vodíku, sekreční imunoglobulin A, epidermální růstový faktor a trávicí enzymy α -amylázu, lipasu a kalikrein (Gelberg, 2014). Dále ústní dutina přechází v jícn, svalovou trubici procházející krkem a hrudníkem, která ústní dutinu spojuje se žaludkem (Goyal et Chaudhury, 2006). Epitel jícnu se skládá z více buněčných vrstev, jako ochrana před průchodem nestrávené či pouze částečně strávené potravy (San Roman et Shivdasani, 2011).

Žaludek lze rozdělit na 2 funkční oblasti, a to s oxyntickými (parietálními) žlázami, které zabírají 80 % žaludku a anatomicky zahrnují fundus a korpus (tělo žaludku). V oblasti antra žaludku se nachází pylorické žlázy, které jsou charakteristické buňkami tvořící gastrin (G-buňkami) a zahrnují zbylých 20 % žaludku. Lidský žaludek obsahuje přibližně 1×10^9 parietálních buněk a 9×10^6 buněk gastrinu (Joseph et al., 2003). Parietální buňky vylučují kyselinu chlorovodíkovou (cca pH 0,8). V lidském žaludku se hodnota pH pohybuje okolo 1,4. V žaludečním epitelu jsou přítomny také neuroendokrinní buňky, zahrnující potenciální hormonální a parakrinní signalizaci. Jedná se např. o buňky obsahující somatostatin, amylin, serotonin, melatonin, histamin, ghrelin, obestatin aj. (Schubert, 2008).

Žaludek přechází přes vrátník (pylorus) do tenkého střeva, které můžeme rozdělit do třech funkčních oblastí: dvanáctník (duodenum), lačník (jejunum) a kyčelník (ileum). Epitel tenkého střeva se skládá z tubulózních žlázek, tzv. Lieberkühnových krypt, nacházejících se mezi klky, které vstupují do střevního lumenu a maximalizují povrch pro trávení a absorpci (Li et Jasper, 2016). Epitelové buňky duodena syntetizují enzymy, které společně se žlučí produkovanou játry a pankreatickými trávicími enzymy dokončují trávení proteinů, tuků a sacharidů. Epitel jejunu absorbuje většinu objemu živin a epitel ilea absorbuje vitamin B₁₂ spolu se solemi žlučových kyselin, které se opět vrací do jater.

Na tenké střevo navazuje přes ileocekální chlopeň střevo tlusté. Pohyby tlustého střeva jsou pomalejší, potrava se zde zdržuje 18-24 hodin, tedy 6× déle než v tenkém střevě. I tlusté střevo lze rozdělit do třech částí: slepé střevo (intestinum caecum), tračník (colon) a konečník (rectum) (Thompson et al., 2018). Slepé střevo a vzestupný tračník hrají významnou roli v absorpci vody a elektrolytů a fermentaci nestrávených sacharidů. Sestupný tračník, esovitá klička tlustého střeva a konečník se převážně podílejí na skladování a odvádění stolice. Sliznice tlustého střeva má hladký povrch, bez klků, ale s četným množstvím krypt, vylučujících hlen do lumen (Phillips et al., 1993).



Obrázek 1: Trávicí soustava

Trávicí šťávy gastrointestinálního systému se vylučují k podpoře enzymatického štěpení bílkovin, sacharidů a tuků, zatímco svalové kontrakce celého traktu zajišťují mechanické zpracování, chemické trávení, absorpci a transport (Ferrua et Singh, 2010). Motilita gastrointestinálního traktu je zajištěna všudypřítomnou elektrickou aktivitou. V žaludku a tenkém střevě prochází pomalé vlny za změny membránového potenciálu, které koordinovaně podporují svalstvo traktu (Sanders et al., 2006). Vnější vrstva střevní stěny, tvořena svalovými vlákny, umožňuje promíchání a přesun obsahu traktu. Kontrola motility závisí na aktivitě enterické nervové soustavy, která vytváří síť neuronů nacházejících se v gastrointestinální stěně (Bornstein, 2008).

Stěna gastrointestinálního traktu je složena ze čtyř vrstev, tj. mukózy (sliznice), submukózy, vnější svalové vrstvy a serózy. Svalová vrstva se skládá z vnější longitudinální a vnitřní cirkulární vrstvy. Submukóza a mukóza bohaté na kolagen se nachází uvnitř svalové vrstvy. Další tenká vrstva svalů - *muscularis mucosae*, se nachází téměř po celé délce traktu (Liao et al., 2009). Epitel gastrointestinálního traktu je chráněn sekrecí hlenu, jehož hlavní složkou je glykoprotein mucin. Dále obsahuje soli, lipidy a proteiny podílející se na obraně vnitřního prostředí, jako jsou růstové faktory, imunoglobuliny nebo lysozym. Tvorba a vylučování hlenu může trvat několik minut až hodin, v závislosti na orgánu a na situaci, např. invazi patogeny, která vyžaduje rychlou reakci epitelu. Stejně tak se liší tloušťka hlenovité vrstvy (Derrien et al., 2010). Ústní dutina je pokryta slinným filmem 70 - 100 μm , žaludeční stěna vykazuje silnější hlenovou vrstvu, přibližně 300 μm , která chrání žaludeční epitel před kyselou žaludeční šťávou. Tenké střevo je převážně pokryto volně připojenou hlenovou vrstvou 150 - 400 μm , která je nejtenčí v jejunu, kde dochází k hlavnímu příjmu živin. V tlustém střevě stoupá tloušťka hlenu až na 800 - 900 μm v distální části (Atuma et al., 2001). Hlenová vrstva se dále dělí na dvě různé vrstvy. Vnější vrstva je neadherentní, z velké části rozpustná a je neustále odstraňována spolu s potenciálně nebezpečnými činiteli (např. mikroorganismy nebo viry). Vnitřní adherentní vrstva pevně přiléhá k epitelu, není rozpustná ve vodě a působí jako selektivní bariéra a umožňuje průchod pouze pro menší molekuly. Zatímco vrchní vrstva je bohatá na mikrobiom, spodní vrstva neobsahuje téměř žádné bakterie (Hansson et Johansson, 2010).

3.2 Mikrobiom trávicího traktu člověka

Trávicí soustava člověka se skládá z funkčně odlišných oblastí – ústní dutiny, žaludku, tenkého a tlustého střeva. Liší se tedy i mikroorganismy, které se v těchto částech nachází, a to kvantitativně i kvalitativně. Odhaduje se na 10^{14} (Cooper et al., 2007) buněk gastrointestinálního mikrobiomu, který zahrnuje bakterie, archea, eukaryota a viry. Množství, typ a funkce mikrobiomu se liší podle místa trávicího traktu, ale většina se nachází v tlustém střevě, kde se mj. podílí na fermentaci složek potravy, zejména sacharidů / vlákniny a na formování stolice. (Hattori et Taylor, 2009; Conlon et Bird, 2015). Pomocí 16S rRNA genu byla analyzována (Eckburg et al., 2005) mikrobiální rozmanitost a bylo zjištěno, že 98 % druhů patří ke čtyřem bakteriálním kmenům (Tab. 1) – Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria a Actinobacteria. Proteobacteria jsou běžné, ale obvykle nejsou dominantní (Dave et al., 2012).

Tabulka 1: Kmeny mikrobiomu trávicí soustavy a jejich rody

Kmeny	Rody
Firmicutes	<i>Lactobacillus, Clostridium, Faecalibacterium, Streptococcus, Eubacterium</i>
Bacteroidetes	<i>Bacteroides</i>
Proteobacteria	<i>Escherichia</i>
Actinobacteria	<i>Bifidobacterium</i>

Pomocí kultivace byla zkoumána mikrobiální ekologie, kdy až 80 % střevních bakterií nemůže být kultivováno konvenčními technikami. Je to především z důvodu nároků bakterií na živiny, anaerobní podmínky a komplexní závislosti jednoho organismu na druhém (Bäckhed et al., 2005; Dave et al., 2012). Nejvíce rozmanité a bohaté mikrobiální společenstva se vyskytují v dutině ústní, kde se nachází 750 druhů mikroorganismů a distální části gastrointestinálního traktu. Poměrně jednoduchý je pak mikrobiom jícnu, žaludku a tenkého střeva (Hattori et Taylor, 2009). Některé bakterie vytvářejí biofilmy a zvyšují tak odolnost vůči kolonizaci potencionálních patogenů a podílejí se na stimulaci imunitních a hormonálních systémů hostitele. V těchto strukturách se udržují především *Bacteroides* spp., *Bifidobacterium* spp., Firmicutes (např. *Lactobacillus* spp.) a *Fusobacterium* spp. Biofilm vytváří ochranu pro bakterie, umožňuje komunikovat přímo s hostitelem a prodloužit jejich pobyt v gastrointestinálním traktu s vyšší metabolickou činností. Zvláštním znakem biofilmu je přítomnost mikroaerofilního prostředí na bazální straně a anaerobních podmínek na vrcholu (Marzorati et al., 2010).

V žaludku dospělého člověka se nachází 10^2 až 10^4 KTJ/ml bakterií (Petra et al., 2017). Vzhledem k nízkému pH v žaludku se dříve věřilo, že se zde nevyskytuje složitější mikrobiom, až na několik výjimek, především *Helicobacter pylori*, nejčastější lidský patogen, který neutralizuje kyselé prostředí žaludku a je původcem gastroduodenálních onemocnění, např. vředů nebo rakoviny žaludku (Savage, 1977; Kafshdooz et al., 2017). Podle Bik et al. (2006) žaludek však zahrnuje různorodé mikrobiální společenství, kterému dominují kmeny stejné jako u dutiny ústní a jícnu, ale složení bakterií se výrazně liší. Převládá zde *Lactobacillus* spp, *Streptococcus* a *Prevotella*, které jsou odolné vůči kyselému prostředí. Složení v žaludečním antru a samotném tělu žaludku je pak téměř totožné (Zilberstein et al., 2007; Wang et al., 2014). V duodenu se počty bakterií pohybují kolem 10^3 - 10^5 KTJ/ml a směrem k ileu se zvyšují až na 10^8 KTJ/ml (Ley et al., 2006). Pokud jde o rozmanitost, duodenum, jejunum a ileum jsou obohaceny hlavně o Firmicutes (*Lactobacillaceae*), Proteobacteria (*Enterobacteriaceae*) a Actinobacteria (*Bifidobacterium* a *Collinsella*) (Araújo et al., 2017). Mikrobiom tenkého střeva je méně složitý než u tlustého střeva a obsahuje více fakultativně anaerobních bakterií (Hayashi et al., 2005).

Nejvíce bakterií s vysokou druhovou rozmanitostí se nachází v tlustém střevu s přibližně 10^{11} - 10^{12} KTJ/g (Ley et al., 2006). Mezi první bakterie kolonizující střevo patří aerobní a fakultativní bakterie, jako jsou koliformní bakterie, laktobacily a streptokoky. Kolonizace těmito druhy snižuje oxidačně-redukční potenciál ve střevě ve prospěch růstu anaerobních bakterií, jako jsou *Bacteroides* a *Bifidobacteria*. Se zavedením tuhé stravy se mikrobiom stále více podobá mikrobiomu dospělého člověka, kde převažují anaerobní bakterie (McCracken et Lorenz, 2001). Jakmile mikrobiom dosáhne zralosti, zůstává převážně stabilní až do stáří, ačkoli se u starších lidí vyskytují určité rozdíly, než u mladých dospělých a vyznačuje se menší variabilitou. Starší lidé např. zaznamenávají významné snížení bakterií rodu *Bifidobacterium*. Tato zjištění mohou souviset s větším počtem nemocí u starších osob a s léky používaných k jejich léčbě (Roca-Saavedra et al., 2017).

U dospělého člověka se v tlustém střevě vyskytují z 90 % kmeny Firmicutes a na rozdíl od tenkého střeva hlavně Bakteroidetes. Zajímavé je, že v horní části střevních Lieberkühnových krypt obvykle dominuje Firmicutes, zatímco na dně dominuje Proteobacteria (Araújo et al., 2017). Rod *Clostridium*, *Enterobacteriaceae* a *Streptococcus* jsou také významné rody, ale v tlustém střevě méně početné (Roca-Saavedra et al., 2017). Počty i rozmanitost bakterií se zvyšují od proximálních oblastí směrem k distálním. Naopak oxidačně-redukční potenciál distálně klesá, proto je více než 99 % bakterií nacházejících se v tlustém střevě anaerobních (McCracken et Lorenz, 2001).

Gastrointestinální mikrobiom se intenzivně podílí na proliferaci lidských střevních buněk a pomáhá udržovat jejich homeostázu. Zároveň však může být příčinou různých onemocnění. Vytvoření i udržování intestinálního mikrobiomu může být ovlivněno dietou, způsobem narození nebo interakcemi mezi mikrobiomem či mikrobiomem a hostitelem (Hattori et Taylor, 2009). Zásadní roli při udržování zdraví hostitele hraje rezistentní mikrobiom. Např. laktobacily mohou indukovat sekreci mucinu. Bakterie rodu *Bacteroides thetaiotaomicron* mohou modulovat expresi genů podílející se na absorpci živin, fortifikaci mukózní bariéry a metabolismu xenobiotik. Také mohou podporovat útlum prozánětlivé exprese cytokinů. Stejný pozitivní efekt byl objeven u *Lactobacillus acidophilus* (Marzorati et al., 2010).

3.2.1 Symbiotické bakterie

Lidské střevo vytváří vhodné prostředí pro rozsáhlá společenství symbiotických bakterií. Tyto bakterie jsou schopné metabolizovat látky, např. rostlinné polysacharidy, které jsou jinak člověkem nestravitelné a zásadně tak přispívají k metabolismu živin. Konečné produkty metabolizovaných látek působí také jako signální molekuly a mají přímý vliv na mozkovou, střevní, jaterní, tukovou a svalovou tkáň (MacFarlane et MacFarlane, 2010; Cash et al., 2016). Samotná bakteriální buněčná hmota stimuluje peristaltické pohyby, čímž usnadňuje průchod zbytků trávení střechem. Dojde-li k nerovnováze střevního mikrobiomu, snížení mikrobiální diverzity a následnému nedostatku specifických složek, které hostitele chrání před patogeny, může dojít k zánětlivému střevnímu onemocnění (Louis et al., 2014).

K nejintenzivnější mikrobiální aktivitě dochází v proximální části tlustého střeva, kde je vysoká dostupnost substrátů. Nestravitelné složky stravy, ale také produkty organismu (především mucin), které se dostávají do tlustého střeva, jsou fermentovány anaerobním mikrobiomem a dochází tak ke vzniku metabolitů. U zdravého dospělého člověka jsou hlavními produkty plyny a organické kyseliny. Nesnadno stravitelné sacharidy, jako polysacharidy stěn rostlinných buněk, rezistentní škrob a některé rozpustné oligosacharidy (např. frukto-oligosacharidy), jsou obvykle primárním substrátem pro mikrobiální fermentaci. Díky fermentaci sacharidů v této části střeva je pH kyselejší (MacFarlane et MacFarlane, 2010) a směrem k distální části se postupně blíží k neutralitě. To ovlivňuje fyziologické a biochemické procesy, jako je vazba žlučových kyselin na zbytky potravy, odstraňování vodíku, fermentace peptidů nebo aktivitu proteolytických a peptidolytických enzymů (Louis et al., 2014). Při katabolismu sacharidů v tlustém střevě

vznikají vlivem fermentujících anaerobních bakterií vodík, oxid uhličitý, metan a mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA). Jedná se především o kyselinu máselnou, propionovou a octovou, přibližně v poměru 1:1:3 (Inglis et al., 2012). Zástupci kmenu Bacteroidetes produkují propionovou a octovou kyselinu, zatímco bakterie kmene Firmicutes, zejména klostridie či *Faecalibacterium prausnitzii*, produkují máselnou kyselinu. Tyto mastné kyseliny s krátkým řetězcem mají schopnost potlačit zánět a hrají důležitou roli jako produkty pro glukosu, cholesterol a metabolismus lipidů (LeBlanc et al., 2017). Především kyselina máselná je důležitým zdrojem energie pro buňky sliznice tlustého střeva, které mohou až ze 70 % své energetické potřeby získat prostřednictvím fermentace a má vliv na regulaci imunitního systému. V reakci na zvýšený příjem živočišných produktů, tedy při zvýšené konzumaci bílkovin a tuků, se zvyšuje množství zástupců kmenu Bacteroidetes, zatímco počet zástupců kmene Firmicutes klesá (Louis et al., 2014; Haque et Haque, 2017).

Fermentace bílkovin je typická pro distální část tlustého střeva, je ovlivněna dostupností sacharidů a vede k produkci mastných kyselin s rozvětveným řetězcem (BCFA), amoniaku, thiolů, fenolů a indolů (Koecher et al., 2014). BCFA jsou důležitým dárce dusíku pro aminokyseliny, jako glutamin nebo alanin, které jsou zdrojem energie pro gastrointestinální trakt. Mnohé z těchto látek jsou potenciálně toxické a mají karcinogenní efekt. Ochranu před nežádoucími účinky těchto plynů vytvářejí metabolity sacharolytických laktobacilů (Nyangale et al., 2012; Pessione, 2012).

Metabolismus člověka dále ovlivňují bifidobakterie a bakterie mléčného kvašení, které syntetizují vitamín K a většinu vitamínů skupiny B, jako biotin, kobalamin, kyselinu listovou, kyselinu nikotinovou, kyselinu pathotenovou, pyridoxin, riboflavin a thiamin (LeBlanc et al., 2013). *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *B. infantis* a další druhy bifidobakterií produkují v tlustém střevu enzym fytázu pro trávení kyseliny fytové a tím zvyšují dostupnost vápníku, hořčíku a fosfátů. *L. helveticus*, *B. longum*, *Escherichia* a *Enterococcus* produkují kyselinu gama-aminobutyrovou (GABA), serotonin, dopamin, katecholaminy a acetylcholin ovlivňující funkci mozku a chování (Daliri et al., 2016). Samotný rod *Lactobacillus* je velmi heterogenní a zahrnuje širokou škálu druhů. Mezi běžné laktobacily izolované z lidského gastrointestinálního traktu patří *L. acidophilus*, *L. gasseri* (obr. 2), *L. salivarius*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. brevis* (obr. 3) a *L. reuteri* (Yadav et al., 2017). Obecně patří laktobacily mezi gram-pozitivní bakterie, využívající sacharidy jako hlavní zdroj výživy. Kyselina mléčná, jako hlavní konečný produkt jejich fermentace glukózy, vede ke snížení pH o jednu nebo více jednotek. Kromě mléčné kyseliny produkují i kyselinu octovou

a peroxid vodíku a dokáží tak potlačit růst potenciálně patogenních organismů, jako jsou *Staphylococcus*, *Pseudomonas* a *Salmonella* (Nord et Lidbeck, 1993).



Obrázek 2: *L. gasseri*

Zdroj: (<http://www.supplementsglobal.com/products/lactobacillus-gasseri-250billion-cfug/>)



Obrázek 3: *L. brevis*

Zdroj: (<http://www.supplementsglobal.com/products/lactobacillus-brevis/>)

3.2.2 Patogenní bakterie

Lidský organismus je chráněn před potenciálně škodlivými mikroorganismy pomocí fyzikálních a chemických bariér, které jsou vytvářeny imunitním systémem člověka, prostředím (přítomností kyseliny chlorovodíkové a žlučových solí) a rezidentním střevním mikrobiomem. Některé bakterie jsou schopné zničit konkurenty, včetně patogenů, pomocí vylučování bakterocidních látek nebo modulací imunitních funkcí (Vogt et al., 2015). Udržování vyváženého střevního mikrobiomu je důležité pro lidské zdraví a v případě změny stravy, zánětů, zhoršené imunity, infekce, antibiotik či vystavení toxiny, může dojít ke změně složení střevního mikrobiomu, tzv. dysbióze (Zeng et al., 2017). Dysbióza je pak často spojena se zvýšenou náchylností k infekcím a také k nepřenositelným nemocem, jako je obezita, metabolické syndromy (např. diabetes nebo kardiovaskulární onemocnění), alergie a jiná zánětlivá onemocnění a v některých případech i neurologické poruchy (Sirisinha, 2016).

Přední vliv na kolonizaci patogenními bakteriemi má efektivní využívání živin, o které patogenní druhy soutěží s komenzálními bakteriemi. Dysbióza střevního mikrobiomu může zároveň poskytovat některým bakteriím, které jsou ve střevu zastoupeny v menším množství, růstovou výhodu a tyto druhy mohou přispívat k onemocněním. Jedná se především o Enterobakterie, nacházející se přirozeně ve střevě v malém množství v těsné blízkosti epitelu sliznice, vzhledem k jejich vyšší toleranci ke kyslíku difundovaného z epitelu. Tento rod zahrnuje *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. a *Proteus* spp., které mají potenciál k nadměrnému růstu a střevní „nadvládě“ během dysbiózy (Zeng et al., 2017). Rod *Bacteroides* např. přispívá k důležitým metabolickým funkcím a obecně udržuje prospěšný vztah k hostiteli, pokud je uchováván ve střevním lumenu, ale někteří zástupci tohoto rodu mohou být patogenní. *Bacteroides fragilis* se typicky nachází v dolní části gastrointestinálního traktu a prokázalo se, že má příznivé účinky, jako je stimulace rozvoje imunitního systému hostitele. Enterotoxigenní *B. fragilis* (ETBF) však produkuje toxin, který způsobuje kolitidu (Sears, 2009). Zástupci rodu *Clostridium*, kteří se nacházejí ve střevním traktu, kde kolonizují záhyby sliznice a vytvářejí úzký vztah se střevními epitelálními buňkami, které podporují pomocí produkce kyseliny máselné. Rod *Clostridium* také zahrnuje důležité patogeny, jako *C. perfringens* a *C. tetani* nebo *C. difficile*, způsobujících onemocnění. *Enterococcus* spp. a *Streptococcus* spp., které se běžně vyskytují v malém množství, mohou působit jako patogeny během intestinální dysbiózy (Kim et al., 2017).

Mezi nejběžnější střevní patogeny, způsobující gastrointestinální infekci např. po léčbě antibiotiky, patří *Salmonella enterica*, *Vibrio cholerae*, *E. faecalis*, patogenní kmeny *E. coli* a především *Clostridium difficile* (Rakowska et al., 2016). *Salmonella enterica* patří mezi intracelulární patogeny a při pomnožení ve střevě může vyvolat nemoci od mírné gastroenteritidy, až po břišní tyfus při rozsáhlé kolonizaci (Yurist-Doutsch et al., 2014). Příbuzný druh bakterie *E. coli* zahrnuje mimo patogenních kmenů také probiotické a komezální kmeny, které prospívají nebo mají malý vliv na svého hostitele (Do et al., 2017). Patogenní kmeny se fenotypicky dělí na dvě skupiny, a to střevní a mimostřevní. Mezi kmeny, které infikují, kolonizují gastrointestinální trakt a obvykle způsobují sekreční nebo krvavý průjem patří enterotoxigenní *E. coli* (ETEC), enteropatogenní *E. coli* (EPEC), enteroagregativní *E. coli* (EAEC), Shiga toxin (STEC) produkující *E. coli*, jako je enterohemoragická (EHEC), enteroinvazivní *E. coli* (EIEC) a *Shigella spp.*, adherentně invazivní *E. coli* (AIEC) a difúzně adherentní *E. coli* (DAEC). Zatímco některé patovary ovlivňují tenké střevo, jiné způsobují infekci v tlustém střevu (Rossi et al., 2017).

3.2.3 Probiotika, prebiotika a synbiotika

Probiotika jsou živé nepatogenní mikroorganismy, schopné kolonizovat sliznici tlustého střeva (van Wyk, 2015). Do trávicí soustavy se dodávají perorálně, a aby se dostala do střev a byla účinná, existují pro klasifikaci probiotických bakterií jako probiotik specifická kritéria. Kmen musí být bezpečný původem a musí být rezistentní vůči antibiotikům. Musí také přežít průchod gastrointestinálním traktem a vykazovat imunomodulační účinky (Lee et Salaminien, 2009). Důležitá je především schopnost přežít v kyselém prostředí žaludku, kde pH může dosáhnout až 1,5 (Sarao et Arora, 2017). Dále také musí splňovat požadavky spojené s technologií jejich výroby, což znamená, že mají být schopny přežít a udržovat své vlastnosti během zpracování, přepravy a skladování. Probiotika musí mít navíc prokázané klinické zdravotní výsledky (West et al., 2009). Zdraví hostitele ovlivňují buď probiotika samotné nebo působením na další mikrobiom. Mohou posilovat různé obranné mechanismy, upravovat vrozenou a adaptivní imunitu, odstraňovat toxiny, karcinogeny a patogeny, uvolňovat antioxidanty a stimulovat gastrointestinální motilitu (Nosova et al., 2000). Výběr probiotik je také založen na schopnosti přilnout ke gastrointestinální sliznici a konkurenčnímu vyloučení patogenů. Přilnavost a kolonizace slizničních povrchů jsou možnými ochrannými mechanismy proti patogenům prostřednictvím soutěže o vazebná místa a živiny nebo imunitních modulací. Adheze k epiteliálním buňkám je důležitým krokem jak pro patogenní bakterie, tak pro probiotika, což naznačuje potenciální interakci mezi nimi.

(Collado et al., 2007). Např. díky druhově specifické adaptaci na lidskou sliznici a dostupnosti genomové sekvence byl *L. gasseri* vyhodnocen jako vhodné probiotikum. Schopnost kolonizovat střevní sliznici zahrnuje toleranci k prostředí s nižším pH, odolnost vůči žlučovým solím a adheze ke střevnímu epitelu. Díky produkci bakteriocinu a imunomodulačních systémů pak vyvolává zdravotní přínosy, jako zmírnění průjmů nebo infekce *Helicobacter pylori* (Selle et Klaenhammer, 2013).

Probiotické produkty mohou obsahovat jeden nebo více vybraných mikrobiálních kmenů (West et al., 2009). Mezi běžně používané probiotické mikroorganismy patří *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. salivarius*, bifidobakterie, *Bacillus coagulans*, *Escherichia coli* (kmen Nissle 1917), některé enterokoky, zejména *E. faecium* a kvasinky *Saccharomyces boulardii* (Pandey et al., 2015). Probiotické laktobacily jsou spojovány s prevencí a léčbou gastrointestinálních poruch, jako je rotavirový průjem nebo průjem spojený s antibiotiky, ale byly také navrženy jako potenciální léčba proti syndromu dráždivého střeva a zánětlivému onemocnění střev. Adherentní schopnosti laktobacilů souvisí s jejich povrchovými vlastnostmi, které jsou zase ovlivněny složením, strukturou a uspořádáním buněčné stěny, které přispívají např. k její hydrofobicitě (Deepika et Charalampopoulos, 2010).

Probiotické kmeny mají velmi specifické účinky. Některé, především laktobacily, ale také bifidobakterie, mohou produkovat antibakteriální produkty (např. bakteriociny, peroxid vodíku a organické kyseliny), které mohou inhibovat růst patogenů, jako jsou *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella Enteritidis*, *E. coli*, různé druhy *Shigella*, *Staphylococcus* a *Yersinia* (Haque et Haque, 2017; Markowiak et Śliżewska, 2017). Hydrolytické enzymy produkované některými probiotiky přispívají ke zvýšení množství mléčné, propionové, máselné kyseliny a dalších mastných kyselin s krátkým řetězcem v intestinálním lumenu, což snižuje luminalní pH a tím mohou inhibovat patogenní bakterie (Asahara et al., 2004). Probiotika také soutěží s jinými mikroorganismy o některé prvky, např. o železo, které je nezbytným prvkem téměř všech mikroorganismů. Probiotická *E. coli* (Nissle 1917) má několik mechanismů vylučování železa, což jí umožňuje efektivně inhibovat růst jiných střevních patogenů (Grosse et al., 2006).

Probiotika se dále podílejí na metabolismu žlučových kyselin a syntéze vitaminů. Probiotické mikroorganismy, jako je *L. plantarum*, *L. reuteri*, *Bifidobacterium adolescentis* a *B. pseudocatenulatum* jsou přirozenými producenty vitaminů skupiny B (Nova et al., 2007; Pompei et al., 2007). Účinně ovlivňují nervový systém a endokrinní systém, jsou podávány

pro léčení gastrointestinálních onemocnění, jako je infekční průjem, průjmy spojené s antibiotiky nebo s *C. difficile* (zejména *L. rhamnosus* a *Saccharomyces boulardi*), infekční gastroenteritida, zácpa, zánětlivé nemoci jako je zánětlivé onemocnění střev, Crohnova nemoc, ulcerózní kolitida, infekce *H. pylori*, intolerance laktózy, syndrom dráždivého tračníku a autoimunitních onemocnění včetně diabetes mellitus 1. typu (Cooper et al., 2007).

Probiotika také zvyšují účinnost imunologického systému, mají anti-karcinogenní vlastnosti, zvyšují absorpci vitaminů a minerálních látek a stimulují tvorbu aminokyselin. Probiotické mikroorganismy mohou také produkovat enzymy, jako je esteráza, lipáza a koenzymy A, Q, NAD a NADP. Mezi produkty metabolismu některých probiotik patří i antibiotika, jako např. vacidofilin, bacitracin anebo laktacin (Nova et al., 2007; Markowiak et al., 2017).

Prebiotikum je nestravitelná složka potravy, která příznivě ovlivňuje hostitele. Aby bylo prebiotikum účinné, nesmí být látka hydrolyzována, ani absorbována v horní části trávicího traktu ani tenkým střevem (Sarao et al., 2017). Na rozdíl od probiotik nejsou prebiotika tedy živými přípravky, nýbrž jedná se o potravinářské přísady, které se dostávají do tlustého střeva, kde mohou být fermentovány sacharolytickými bakteriemi (např. rod *Bifidobacterium*), ale nejsou tráveny. Fermentace prebiotik může prospět hostiteli stimulací mikrobiálního růstu a aktivity, umožňuje endogenním bakteriím produkovat energii a metabolické substráty (Van Loo et al., 2005; Ho et al., 2015). V důsledku fermentace sacharidů může *Bifidobacterium* nebo *Lactobacillus* produkovat některé sloučeniny, které způsobí snížení střevního pH a inhibují tak vývoj gastrointestinálních patogenů. Bylo rovněž prokázáno, že podávání prebiotik zvyšuje absorpci minerálů, zejména hořčíku a vápníku (De Preter et al., 2011). Nejběžnějšími probiotickými látkami jsou oligosacharidy, které mají potenciál stimulovat růst selektivních a prospěšných střevních bakterií, zejména laktobacilů a bifidobakterií (Bouhnik et al., 2004; Lee et al., 2009). Patří sem především ruktooligosacharidy, galaktooligosacharidy, isomaltooligosacharidy, xylooligosacharidy, transgalaktooligosacharidy a sójové oligosacharidy. Také polysacharidy, jako inulin, refluxní škrob, celulóza, hemicelulóza nebo pektin, mohou být potenciálně prebiotiky (Markowiak et al., 2017). Prebiotika vykazují pozitivní výsledky v oblasti nadváhy a obezity, ukázala se jako užitečné při hypercholesterolemii, při opakovaných výskytech průjmu spojeného s *C. difficile* či snížení ekzému při použití kombinace galaktooligosacharidu a fruktooligosacharidu (Patel et al., 2015). Je však třeba zmínit, že předávkování prebiotiky může vést k nadýmání a průjmu. Pokud se však prebiotika používají ve správných

dávkách, nevznikají žádné nežádoucí účinky, jako je průjem nebo náchylnost k UV záření (Markowiak et Ślizewska, 2017).

Synbiotika jsou kombinací prebiotik a probiotik a mají schopnost formovat střevní mikrobiom (Ho et al., 2015). Byla vyvinuta k překonání případných problémů s přežíváním probiotik během průchodu horní částí trávicího traktu (Peña, 2007). Mají usnadnit přežití a aktivitu prokázaných probiotik a zároveň mají stimulovat původní anaerobní bakterie přítomné v gastrointestinálním traktu, kde zvyšují především hladinu laktobacilů a bifidobakterií (Zhang et al., 2010; Patel et Dupont, 2015). Probiotické kmeny používané v synbiotických přípravcích zahrnují *Lactobacilli*, *Bifidobacteria spp*, *S. boulardii*, *Bacillus coagulans* aj., zatímco hlavní použité prebiotika zahrnují oligosacharidy jako je fruktooligosacharid, galaktooligosacharid a xyloseoligosacharid a inulin (Pandey et al., 2015). Vzhledem k tomu, že probiotikum je aktivní v tenkém a tlustém střevě a účinek prebiotika je pozorován hlavně v tlustém střevě, jejich kombinace může mít synergický účinek a vytvořit tak životaschopné mikrobiologické doplňky stravy s pozitivním vlivem na zdraví hostitele (Hamasalim, 2016).

3.3 *In vitro* modely trávicí soustavy

In vitro trávicí modely byly původně vyvinuty jako nástroje pro výzkum charakterizace a objasnění strukturálních a biochemických změn potravinových složek nebo léčiv za fyziologických podmínek, způsobených enzymy, motilitou gastrointestinálního traktu a také mikrobiomem (Bornhorst et al., 2016). Nejběžnějšími sledovanými parametry v *in vitro* studiích jsou: stravitelnost / degradace > biologická dostupnost > stabilita vzorku > strukturální změny (Jin et al., 2011). Přestože studie na zvířatech *in vivo* jsou stále považovány za „standart“ pro řešení biologické dostupnosti, absorpci, metabolismus a vylučování, *in vitro* modely trávicí soustavy mají tu výhodu, že jsou rychlejší, méně náročné na práci, nemají etické omezení, a proto se stále častěji využívají pro posouzení osudu látky v zažívacím traktu (Lefebvre et al., 2015). Jsou především výhodné, pokud se jedná o potenciálně škodlivé látky, jako jsou např. xenobiotika nebo patogenní organismy. Studium osudu přijatých mikroorganismů v lidském gastrointestinálním traktu je však nezbytné nejen pro vyhodnocení rizika infekcí přenášených potravinami, ale také pro posouzení zdravotního účinku prospěšných mikroorganismů, jako jsou probiotika (Guerra et al., 2012). V praxi jakákoli *in vitro* metoda nevyhnutelně neodpovídá přesnosti, kterou lze dosáhnout skutečným studiím potravin *in vivo* kvůli vlastní složitosti celého procesu. V důsledku toho je zapotřebí nějakého kompromisu mezi správností a snadností využití jakéhokoli modelu *in vitro* trávení, který by měl být co nejvíce přesný, flexibilní a reprodukovatelný (Jin et al., 2011). Existuje tedy skutečná potřeba *in vitro* modelů, které napodobují fyziologické procesy lidského trávení, mj. s přihlédnutím na přítomnost trávicích enzymů a jejich koncentrací, pH, času trávení a koncentrací solí. Simulované modely trávení typicky zahrnují orální, žaludeční a střevní fázi a v některých případech i střevní fermentaci (Minekus et al., 2014).

Pro přesnější simulaci *in vivo* byly vyvinuty a v mnoha studiích použity různé dynamické modely, které např. zohledňují specifitu jednotlivých částí žaludku, kde jsou mnohem rozsáhlejší změny pH a koncentrace enzymů než změny v tenkém střevě a také zde dochází k rozdělení dvou hlavních funkcí žaludku. Jeho vyšší část, fundus, má zásadní přínos pro sekreci žaludeční kyseliny a enzymů (pepsin, žaludeční lipáza), zatímco spodní část, antrum, vytváří mechanické síly pro smíchání, narušuje a transportuje žaludeční obsah peristaltickými pohyby (Sams et al., 2016). Dynamické modely používají také různé řídicí systémy, které regulují teplotu, změny pH v žaludku a dvanáctníku, řídí vyprázdnění žaludku, přidání pepsinu a pankreatické šťávy a žluči a dialýzu koncových produktů zažívání.

Tyto studie byly většinou použity pro specifické aplikace, jako studie antacidové aktivity nebo přežití probiotik (Guerra et al., 2012). Jedná se např. o holandský model gastrointestinálního traktu TIM (TNO *in vitro* model of the gastrointestinal tract). Tento model se skládá ze žaludku a tří částí tenkého střeva - duodena, jejunu a ilea. Obsahuje klíčové parametry lidského trávení: teplota, kinetika pH žaludku a střeva, doba průchodu, peristaltické míchání a transport, postupné přidávání trávicích šťáv a pasivní absorpce vody a malých molekul prostřednictvím dialýzy (Blanquet-Diot et al., 2009). I přes vytvoření vícesložkových systémů, žádný z nich neobsahuje všechny kroky od úst až po tlusté střevo. SHIME (simulátor lidského střevního mikrobiálního ekosystému) integruje celý gastrointestinální trakt, ale byl konkrétněji navržen pro studium interakcí potravinářských složek s rezidentním mikrobiomem (Marzorati et al., 2010).

Nejvíce převládajícími (95%) *in vitro* modely jsou však statické, tedy zahrnují omezený počet simulovaných parametrů (pH, koncentrace enzymu, ředění jídla, míchání), které mají být reprezentativní pro trávení na daném místě v gastrointestinálním traktu (N'Goma et al., 2012). Žaludeční fáze probíhá pomocí hydrolýzy homogenizovaných potravin za přítomnosti pepsinu, a to za stanoveného pH, teploty a po stanovenou dobu (pH 1-2, 37 °C, 1-3 hodiny). Tento krok je následován střevní fází zahrnující pankreatické enzymy se žlučí nebo bez (pH 6-7). Pro vytvoření prostředí trávení jsou využívány simulované žaludeční a střevní tekutiny a pro simulaci složitých peristaltických pohybů se využívá míchání vzorků (Guerra et al., 2012). Statické modely lidského trávení byly použity k řešení rozmanitých vědeckých otázek, jako je stravitelnost a biologická přístupnost (tj. množství sloučeniny, která se uvolňuje z matrice a je považována za dostupnou pro absorpci střevní stěnou) léčiv, mykotoxinů, a makronutrientů, jako jsou proteiny, sacharidy a lipidy. Byly také ale použity pro studium uvolňování mikroživin z matrice, jako jsou minerály, stopové prvky a také sekundární rostlinné sloučeniny včetně karotenoidů a fenolových sloučenin (Minekus et al., 2014)

Od počátku devadesátých let byla vyvinuta řada *in vitro* modelů pro analýzu lidského trávení. Nicméně, navzdory použití farmakologických, fyziologických a biochemických znalostí lidského gastrointestinálního traktu byly získány protichůdné výsledky (Ferrua et Singh, 2010). Problémem byly rozdílné hodnoty a postupy. Např. hodnoty pH je ve statických modelech vysoce variabilní a pohybuje se v rozmezí 1 až 5,5. Ve většině publikací bylo zároveň opomenuto použití lipázy během žaludeční fáze. Pouze 5% publikací na modelech statického trávení použije lipázu, aby se zohlednila žaludeční lipolýza (Sams et al., 2016). Několik studií využilo enzymy shromážděné od lidí, zatímco jiné používají extrahované

enzymy z živočišných nebo rostlinných zdrojů. Zde se pak liší i původ a aktivita enzymů (Almaas et al., 2006). Obvykle jsou však enzymy přidány postupně, aby simulovaly různé kroky trávicího procesu. Je třeba také poznamenat, že enzymy často vyžadují další složky v trávicích tekutinách pro efektivní fungování, např. pankreatická lipáza vyžaduje přítomnost vápníku a žlučových solí (Boisen et Eggum, 1991). Aktivita enzymového přípravku se může časem snižovat, a proto je důležité připravit je čerstvě pro každou studii. Typicky vyšší koncentrace enzymů urychlují trávení nebo degradaci potravinových složek, a proto je důležité používat fyziologicky relevantní hladiny. *In vitro* testované modely rozkladu používaly různé hladiny enzymů, což vedlo ke změnám ve výsledcích mezi studiemi (Jin et al., 2011). Tyto skutečnosti vedly ke snaze sjednocení a byl vytvořen harmonizovaný statický *in vitro* trávicí model (Shani-Levi et al., 2017). COST INFOGEST (Minekus et al., 2014) je mezinárodní síť, do které se zapojilo více než 200 vědců z 32 zemí zabývajících se trávením. Jedním z cílů této sítě je sjednocení podmínek pro simulované trávení potravy. Pokud by se však mělo přihlížet k simulacím trávení u kojenců nebo starších lidí, bylo by zapotřebí dalších změn, např. by se výrazně lišila koncentrace enzymů (Minekus et al., 2014).

3.4 *In vitro* modely střevního epitelu

In vitro buněčné modely jsou jednou z možností nahrazení metod s použitím živých zvířat. Primární epiteliální buňky izolované z gastrointestinálního traktu nejsou tolik používány ke studiu absorpce látek (Lefebvre et al., 2015). Tyto explantátové kultury střevní tkáně, které jsou odebrány z modelových organismů, odděleny od vzorků pacientů nebo shromážděné od dárců lidských orgánů nabízejí plné spektrum buněčné rozmanitosti a střevních funkcí, ale jsou omezeny životaschopností mimo tělo a často je obtížné je získat v dostatečném množství, obzvláště v případě lidských tkání (Hill et Spence, 2017). Účinné *in vitro* systémy často používají immortalizované buněčné linie, které mohou tvořit přilnavou monovrstvu a vytvářet určité charakteristiky epitelu gastrointestinálního traktu (Lefebvre et al., 2015). Buněčné linie jsou po desetiletí důležité pro gastrointestinální pokusy *in vitro* a vedly k velkým poznatkům, ale také mají svá určitá omezení. Jsou však využívány jako součást modelů *in vitro* trávení, mj. pro vyhodnocení účinků probiotik nebo absorpce a transportu léků (Jin et al., 2011; Payne et al., 2012).

Klasické modely *in vitro* sestávají z jedné epiteliální buněčné populace a jsou po mnoho let využívány, i přes to, že se v tak velké míře neshodují se skutečnou strukturou tkáně, buněčnou signalizací nebo náchylností k lidským patogenům (Blutt et al., 2017).

Mezi buněčné linie využívané v *in vitro* modelu a pocházející z nádorů gastrointestinálního traktu patří např. Caco-2, HT-29, T-84 nebo DLD-1 (von Martels et al., 2017). Tyto buněčné linie jsou snadno přístupné a mají vysokou životaschopnost a metabolickou aktivitu, což je činí atraktivními v laboratořích pro testování hypotéz a získání rychlých a rozsáhlých výsledků (Pedersen, 2015). Buňky T-84 jsou velmi vhodné pro *in vitro* model střevního epitelu, protože jsou schopné vylučovat hlen. Nevýhodou je však velmi nízká propustnost monovrstvy (Lefebvre et al., 2015). HT-29 buňky jsou také lidské nádorové buňky, které si zachovaly určité vlastnosti normální tkáně. Při pěstování za standardních podmínek tvoří vícevrstvé převážně nediferencované buňky, pouze s malou částí diferencovaných, buněk produkujících mucin a absorpčních buněk. Morfologie HT29 může být modulována pro různé cesty modifikace. Např. při pěstování v médiu bez glukózy tyto buňky diferencují a získají morfologické vlastnosti absorpčních epiteliálních buněk nebo pohárkových buněk, které vylučují mucin. Byly vyvinuty i další klony buněčné linie HT-29 vylučující hlen, jako např. HT29-MTX, HT29-B6 a HT29-FU (Gonzales et al., 2015).

Caco-2 buňky byly od roku 1989 široce využívány díky vykazování vlastností absorpčních epiteliálních buněk enterocytů, kdy kopírovaly charakteristiky permeability střev u člověka a transport *in vitro* (Foulke-abel et al., 2014). Caco-2 je nejlépe popsanou buněčnou linií, odvozenou z kolorektálního adenokarcinomu. Jedná se o heterogenní buňky, které jsou schopny růst adherentně na pevném povrchu a na mikroporézních membránách a po 2-3 týdnech dokáží díky spontánní diferenciaci vytvořit monovrstvu vysoce polarizovaných buněk, jejichž morfologie i funkční charakteristika je typická pro enterocyty. Dokáží i produkovat enzymy (disacharidasy a peptidázy) a transportní proteiny typické pro absorpci buněk epitelu (Grajek et Olejnik, 2004; Gonzales et al., 2015). Model buněčné kultury Caco-2 tak začal být široce používán jako nástroj pro absorpci bioaktivních složek z potravin a farmaceutických přípravků (Jin et al., 2011). Během příštích 20 let však bylo mnoho buněk Caco-2 klonováno a vyvinuly se tak buňky s velkou rozmanitostí v expresi a lokalizaci proteinů (Foulke-abel et al., 2014). Některé studie totiž naznačovali, že nehomogenita buněk vede ke změnám a nedostatečné reprodukovatelnosti. Aby se získala homogenní populace a tím zlepšila reprodukovatelnost a mezibuněčné spoje, byly vytvořeny klony, jako je TC-7, izolovány z rodičovských buněk Caco-2. Klon TC7 však nemusí být vhodným modelem např. pro intestinální absorpci vysoce lipofilních a špatně absorbovaných sloučenin (Turco et al., 2011).

Jednou z největších nevýhod tohoto buněčného modelu je neschopnost buněk Caco-2 produkovat hlenovou vrstvu. Jelikož mnohé studie komentují funkční nedostatek korelace mezi Caco-2 buňkami a lidským střevem, přišly studie se směsnými kulturami Caco-2 buněk s buňkami, které vylučují mucin, ve snaze zlepšit *in vitro* kultury a přiblížit je co nejvíce *in vivo* reakcím (Blutt et al., 2017). Proto pro simulaci střevní sliznice se buňky Caco-2 kultivují společně s klony buněk HT-29, nejvíce s HT29-MTX, stále častěji používané pro použití realističtějšího modelu. HT29-MTX buňky při kultivaci s buňkami Caco-2 přinášejí významné zlepšení v absorpci různých makromolekul a metabolitů ve srovnání s monokulturou Caco-2 (Gonzales et al., 2015). Buňky Caco-2 a HT-29 byly proto použity ke studiu intestinální absorpce, transportu léků a dalších aspektů transportní fyziologie.

Další důležité omezení současných buněčných linií spočívá v tom, že se skládají z jedné epiteliální buněčné populace, a proto nedokáží vytvořit rozmanitost buněčných typů, které jsou přítomny v normálním střevním epitelu. Každý jednotlivý typ intestinální epiteliální buňky často působí na jiné typy buněk (Foulke-abel et al., 2014). V posledních letech byly navrženy nové a vylepšené intestinální modely. Trojrozměrné (3D) intestinální modely byly zavedeny jako alternativy ke klasickým tak, aby lépe napodobovaly funkce živých tkání. Prokázaly kvalitativně a kvantitativně, že množství hlenu na tomto 3D modelu bylo vyšší ve srovnání s monovrstvou buněk Caco-2. Nicméně tento výsledek nebyl porovnán se směsnými kulturami (Lechanteur et al., 2017). Nedávno byly také vytvořeny střevní organoidy, jako modely lidského intestinálního epitelu, které obsahují všechny hlavní typy epiteliálních buněk, např. enterocyty, pohárkové buňky, enteroendokrinní buňky a Panethovy buňky. Tyto střevní organoidy mohou být pěstovány *in vitro* z kmenových buněk ve střevě a zůstávají geneticky stabilní v kultuře pro mnoho buněčných dělení (měsíce až roky). Také střevní organoidy udržují své specifické charakteristiky, takže je možné rozlišovat mezi ileálním, jejunálním a duodenálním primárním lidským intestinálním epitelem. Modely používající epiteliální buňky mohou být vystaveny bakteriím nebo produktům vylučovaným bakteriemi (von Martels et al., 2017).

3.5 Fenolové sloučeniny

Fenolové sloučeniny jako sekundární metabolity rostlin vznikají z aminokyselin fenylalaninu nebo tyrosinu a podílejí na obraně proti ultrafialovému záření nebo agresi patogenů, kdy jejich koncentrace mohou být v rostlině zvýšeny (Soto-vaca et al., 2012; Baião et al., 2017). V potravinách a nápojích jsou fenolové sloučeniny spojeny se smyslovými atributy, jako je barva, hořkost a trpkost (Babbar et al., 2015). Nacházejí se především v zelenině, bylinách, obilovinách, ovoci a jejich produktech, jako je čaj, červené víno či kakaové výrobky. Potravinové matrice obsahují složitou směs těchto sloučenin s různými koncentracemi. Fenolové sloučeniny obsahují alespoň jednu hydroxylovou skupinu, vázanou na jeden nebo více benzenových aromatických kruhů (Baião et al., 2017). Běžně se fenolové sloučeniny vyskytují konjugované se sacharidy a organickými kyselinami (Cartea et al., 2010). V nerozpustných formách jsou vázány na strukturní složky buněčné stěny, jako je celulóza, hemicelulóza, lignin, pektin a strukturní proteiny (Acosta-Estrada et al., 2014). Podle počtu fenolových kruhů a podle prvků, které tyto kruhy k sobě navzájem váží, řadíme tyto látky mezi fenolové kyseliny, flavonoidy, taniny (hydrolyzovatelné a kondenzované), stilbenoidy nebo lignany (Manach et al., 2004; Kushwaha et Karanjekar, 2011). Některé fenolové látky jsou specifické pro určité potraviny (flavanony v citrusových plodech, isoflavony v sóji), zatímco jiné, jako je kvercetin, se nacházejí ve všech rostlinných produktech, jako jsou ovoce, zelenina, obiloviny, luštěniny, čaj a víno (D'Archivio et al., 2010).

Fenolové kyseliny se vyskytují především ve formě esterů, glykosidů nebo amidů, ale mohou se také vyskytovat ve volné formě (Khoddami et al., 2013). Lze je rozdělit do dvou skupin – hydroxyderiváty benzoové kyseliny (např. galová, p-hydroxybenzoová, protocatechová, vanilová a syringová kyselina), které jsou spíše součástí komplexní struktury, jako jsou hydrolyzovatelné trísloviny, a hydroxyderiváty skořicové kyseliny (např. ferulová, kávová, p-kumarová, chlorogenová a sinapová kyselina). Hydroxyderiváty skořicové kyseliny jsou častější a vyskytují se převážně v glykosylované formě (Huang et al., 2010; Martel et al., 2010). Hlavními zdroji těchto kyselin je ovoce (jablka, třešně, ostružiny, maliny), zelenina (brokolice, salát, rajčata), semena luštěnin, víno a kávová zrna. (Amarowicz et al., 2009). Zatímco ovoce a zelenina obsahují mnoho volných fenolových kyselin, v zrnech a semenech (zejména v otrubách nebo slupce) jsou fenolové kyseliny často vázané (Rosillo et al., 2016).

Flavonoidy jsou vedle karotenoidů a chlorofylů často zodpovědné za modré, fialové, žluté, oranžové a červené barvy v rostlinách. Všechny flavonoidy mají aglykonovou kostru

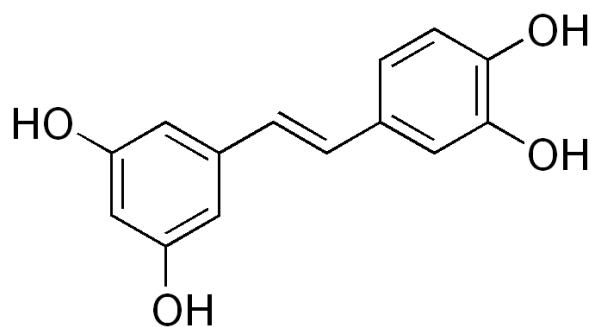
dvou flavonoidních kruhů, spojených jedním heterocyklickým kruhem a zahrnují flavony, flavonoly, flavanony, flavanoly, antokyany a isoflavony (Khoddami et al., 2013; Rosillo et al., 2016). V potravinách, kromě flavan-3-olu, se flavonoidy vyskytují obvykle jako glykosidy nebo konjugáty organických kyselin (Mosele et al., 2015). Flavonoly se běžně vyskytují u mnoha druhů ovoce a zeleniny, jejich obsah se však liší v závislosti na podmínkách pěstování, klima nebo skladování. Flavanony jsou přítomny ve vysoké koncentraci pouze v citrusových plodech, ale vyskytují se také v rajčatech nebo bramborech a některých aromatických rostlinách, jako je máta (Kushwaha et Karanjekar, 2011). Flavonoly nejsou glykosylovány a existují jak v monomerní formě (katechiny), tak ve formě polymeru (proantokyanidiny nebo třísloviny). Katechin a epikatechin, dávají základ polymerním prokyanidinům (Ogah et al., 2014). Antokyany jsou ve vodě rozpustné pigmenty a mohou objevit jako červené, fialové nebo modré, v závislosti na pH. Anthokyaniny se vyskytují ve všech rostlinných tkáních, včetně listů, stonků, kořenů, květů a ovoce. Anthokyanidiny jsou základní struktury antokyaninů a patří sem pelargonidin, kyanidin, peonidin, delphinidin, petunidin a malvidin (Babbar et al., 2015). Isoflavony, sloučeniny citlivé na teplo, jsou strukturálně podobné estrogeneru. Nejbohatší zdroje isoflavonů jsou luštěniny, zejména sójové boby (Baião et al., 2017).

Taniny ve své struktuře obsahují velké množství fenolových kruhů. Jsou rozděleny do dvou skupin – hydrolyzovatelné a kondenzované třísloviny. Hydrolyzovatelné taniny (gallo- a ellagi-taniny) jsou deriváty kyseliny gallové. Tyto taniny jsou hydrolyzovatelné alkalickými sloučeninami, minerálními kyselinami a enzymy (Altemimi et al., 2017). Kondenzované taniny (proanthokyanidiny) jsou strukturálně složitější a rozšířenější. Jedná se převážně o oligomery a polymery flavan-3-diolů (deriváty katechinu nebo epikatechinu) (Huang et al., 2010).

Nejčastějšími lignany v rostlinných produktech jsou syringesinol, pinosinol, lariciresinol, secoisolariciresinol a matairesinol. Konečné mikrobiální produkty secoisolariciresinolu s několika meziprodukty jsou enterodiol a jeho oxidovaný produkt, enterolakton (Mosele et al., 2015). Tato skupina látek je známá také jako fytoestrogeny. Obecně se nacházejí ve vláknině, hlavním zdrojem je lněné semínko (Baião et al., 2017).

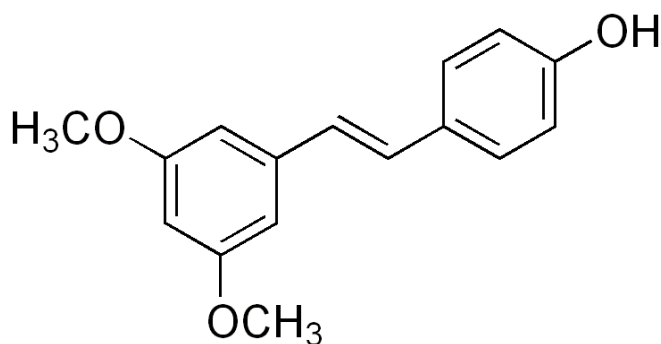
Stilbenoidy jsou fenolové sloučeniny s kyselým a amfifilním charakterem. Mají dva aromatické kruhy spojené etylenovým nebo ethenovým můstkem s řadou substituentů. V přírodě jsou stilbenoidy syntetizovány z fenylalaninu prostřednictvím několika enzymatických reakcí. Necházejí se obzvláště v rostlinách čeledi *Gnetaceae*, *Pinaceae*, *Cyperaceae*, *Fabaceae*, *Dipterocarpaceae* a *Vitaceae* (Rivière et al., 2012). Protizánětlivé

a antioxidační účinky stojí za téměř všemi ostatními pozitivními farmakologickými účinky stilbenoidů. Ve srovnání s oligomerními stilbenoidy byly monomery studovány mnohem intenzivněji. To pravděpodobně souvisí s jejich vyšším výskytem v přírodě a jednoduchou strukturou umožňující jejich snadnější identifikaci (Dvorakova et Landa, 2017). Stilbenoidy existují jako stereoizomery ve formách *cis* a *trans*, v závislosti na tom, kde jsou funkční skupiny navázány na obou stranách dvojné vazby. Nejznámější a nejlépe charakterizovaný stilbenoid je resveratrol. Existují však další, strukturně podobné stilbenové sloučeniny, jako jsou piceatanol, pinosylvin, rapontigenin a pterostilben (Roupe et al., 2006). Piceatanol (*trans*-3, 4, 3', 5'-tetrahydroxystilben) (Obr. 4) se přirozeně vyskytuje v cukrové třtině, bobulích, arašidech a červeném vínu. Jedná se o metabolit resveratrolu. *Trans*-resveratrol produkuje dva hlavní metabolity, z nichž jeden je piceatanol (Piotrowska et al., 2012).



Obrázek 4: Piceatanol

Pterostilben (*trans*-3,5-dimethoxy-4-hydroxystilben) (Obr. 5) je jedním z důležitějších analogů resveratrolu. Nachází se hlavně v borůvkách, ale také např. v santalovém dřevu. Pterostilbenu se připisují větší fyziologické účinky, než u resveratrolu (Peng et al., 2018).



Obrázek 5: Pterostilben

Biologická dostupnost fenolových sloučenin se pohybuje od 0,3 % do 43 % a je určena několika různými faktory, jako je cukerná skupina napojena na aglykon (Linseisen et Rohrmann, 2008). Významně se může také lišit v závislosti na potravinové matrici (vzájemných reakcí, pH, teplotě a struktuře) a také schopnosti organismu absorbovat tyto látky z matrice, na interakci sloučenin s krevními proteiny a buněčnými transportéry (Rosillo et al., 2016; Angelino et al., 2017). Obecně platí, že vyšší biologická dostupnost byla zaznamenána pro isoflavony, následně flavanoly a flavanony, zatímco proanthokyanidiny, flavanol galláty anthokyanidiny jsou hůře absorbovány (Rosillo et al., 2016).

Fenolové sloučeniny existují v přírodě převážně jako konjugáty O- nebo C-glykosidů a v horní části gastrointestinálního traktu dochází pouze k nepatrným změnám (Lewandowska et al., 2013). V ústní dutině jsou fenolové sloučeniny (zejména flavanoly a proanthokyanidiny) částečně uvolněné z potravinové matrice a jsou schopné interagovat s bílkovinami slin bohatých na prolin pomocí vodíkových vazeb nebo hydrofobními interakcemi za vzniku rozpustných agregátů. Tyto agregáty se mohou navzájem vázat vytvářet větší komplexy. Díky změně terciální struktury proteinu, mohou fenolové sloučeniny ovlivnit i jejich činnost (Lewandowska et al., 2013). Absorpce v gastrointestinálním traktu probíhá několika cestami. Účastní se jí mikroorganismy, enzymy a dokonce i glukózové transportéry (Acosta-Estrada et al., 2014). V žaludku silně kyselé prostředí ovlivňuje jejich stabilitu (Lewandowska et al., 2013). Po dosažení tenkého střeva podléhají rozsáhlému metabolismu pomocí enzymů epiteliálních buněk sliznice, které jsou schopné uvolňovat aglykon. Mezi tyto enzymy patří cytosolické β -glukosidázy nebo laktáza-phlorizin hydroláza, která hydrolyzuje především glukózu a galaktózu (Lewandowska et al., 2013; Angelino et al., 2017). Např. u skořicové kyseliny je hlavní cestou pro uvolnění a *in vivo* absorpce hydrolyza intestinální esterázou. V tlustém střevu je většina esteráz mikrobiálního původu. Např. flavonoly jsou degradovány mikrobiotou tlustého střeva, např. *Clostridium* spp. a *Eubacterium* spp., kdy vznikají jednodušší fenolové sloučeniny (Acosta-Estrada et al., 2014). Střevní mikrobiota ovlivňuje metabolismus fenolových sloučenin přeměnou jejich struktury, přidáním nebo odstraněním hydroxylových a methoskupin (Angelino et al., 2017). Uvolněné aglykony jsou po hydrolyze lipofilnější a mohou vstupovat pasivní difuzí do epiteliálních buněk. Po vstupu do vnitřního prostoru enterocytů jsou fenolové sloučeniny transportovány portální žilou do jater, kde dochází, podobně jako u jiných xenobiotik, k dalšímu metabolismu fáze II. Některé metabolity se mohou ale několikrát transportovat zpět do tenkého střeva žlučovodem, metabolizovat a znovu se vracet do jater (Angelino et al., 2017). V játrech dochází především k sulfataci, methylaci a v menším rozsahu

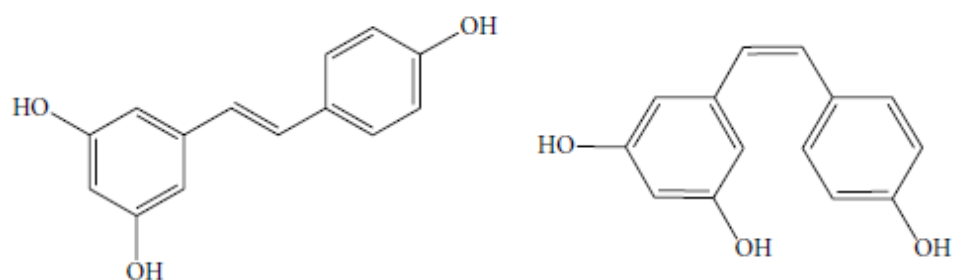
i glukuronidaci. Poté jsou transportovány konjugované metabolity do krevního oběhu a následně se vylučují močí, zatímco zbývající (neabsorbované) metabolity jsou eliminovány se stolicí (Lewandowska et al., 2013).

Fenolové sloučeniny jsou spojovány se širokým spektrem léčivých vlastností, jako jsou antialergické, protizánětlivé, antibakteriální, antitrombotické, vazodilatační a především se projevují jako antioxidanty (Yildirim et al., 2017). Antioxidační aktivita fenolových sloučenin souvisí s jejich chemickou strukturou, která jim dává redoxní vlastnosti. Mohou hrát důležitou roli při adsorpci a neutralizaci reaktivních druhů kyslíku. Z tohoto důvodu se fenolové sloučeniny považují za ochranné látky, schopné zpomalovat vývoj mnoha chronických onemocnění, jako je ateroskleróza (Chedea et al., 2017). Antioxidační aktivita souvisí s počtem a pozicí hydroxylových skupin v molekule. Ztráta jedné hydroxylové skupiny mírně snižuje aktivitu, zatímco ztráta dvou hydroxylových skupin ji snižuje významně. Navíc glykosylace vede k nižší antioxidační aktivitě u některých flavonoidů, jako je kvercetin (Shen et al., 2010). Z *in vitro* a intervenčních studií také rostou důkazy o tom, že některé z biologicky aktivních metabolitů spolu s nezměněnými substráty mohou fungovat jako prebiotika schopné modulovat lidský střevní mikrobiom (Williamson et Clifford, 2017). Fenolové sloučeniny obecně mohou přímo stimulovat nebo inhibovat růst bakterií. Inhibice úzce souvisí s antimikrobiálním účinkem těchto látek, které mají selektivně bakteriostatický nebo baktericidní účinek a inhibují tak růst široké škály potenciálních patogenních bakterií, a tím chrání a prodlužují střevní homeostázu (Mosele et al., 2015). Flavonoly a flavony inhibují aktivity bakteriální helikázy u *Staphylococcus*. Flavan-3-oly, jako je například flavonoidní epigallokatechin gallát, tvoří komplexy s bakteriálními membránami, snižují tvorbu biofilmu patogenů a váží se na enterotoxiny. Flavanony potlačují patogenní geny. (Espín et al., 2017). Zároveň mohou fenolové sloučeniny, zvláště hydrolyzovatelné a kondenzované taniny, díky zmíněným probiotickým účinkům podporovat např. růst laktobacilů a bifidobakterií (Tomás-Barberán et al., 2016).

3.5.1 Resveratrol

Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilben) je přírodní, neflavonoidní fenolová sloučenina, patřící mezi stilbenoidy. Jeho základní struktura se skládá ze dvou fenolových kruhů, spojených dohromady dvojitou styrenovou vazbou. Tato dvojná vazba je zodpovědná za izomerické *cis*- a *trans*-formy resveratrolu (Obr. 6) (Trela et Waterhouse, 1996). Existuje mnoho syntetických a přírodních analogů resveratrolu, jako jsou deriváty nebo konjugáty,

včetně glukosidů. Akumulace těchto látek v rostlinách je způsobena mechanismem rezistence vůči parazitům a dalším nepříznivým podmínkám, jako je houbová infekce, UV záření nebo chemické látky. Na tyto stresující situace reaguje produkcí resveratrolu více než 70 druhů rostlin (Gambini et al., 2015). Nachází se převážně v hroznech, ořechách a bobulích (borůvky, brusinky, červený rybíz), ale i v chmelu. V těchto rostlinách se vyskytuje převážně v glykosidové formě, jako resveratrol-3-O-β-D-glukosid, nazývaný piceid nebo polydatin (Basholli-Salihi et al., 2016).



Obr. 6 *trans*-resveratrol

cis-resveratrol

Pokud je *trans*-resveratrol vystaven slunečnímu záření, umělému světlu nebo UV záření, může dojít k izomeraci na *cis*-formu. *Trans*-izomer je častější a je považován za stabilnější a biologicky aktivní formu (Chedea et al., 2017). Obecně příjem resveratrolu ze stravy je v porovnání s jinými fenolovými sloučeninami nižší. Typický příjem u lidí je menší než 4 mg/den (Christenson et al., 2016). Existuje však značná interindividuální variabilita v biologické dostupnosti resveratrolu (Smoliga et Blanchard, 2014). Při perorálním příjmu se pouze 1-8 % volného resveratrolu nalézá v krvi, 25 % se vylučuje bez absorpce a zbytek (> 70%) se značně metabolizuje v játrech, střevním traktu a pomocí střevní mikrobioty (Bird et al., 2017). V plazmě byla nejvyšší koncentrace volného resveratrolu zaznamenána 30 minut jako důsledek absorpce v žaludku. V tenkém střevu se resveratrol absorbuje relativně vysokou rychlostí, a to pasivní difuzí nebo vytvářením komplexů s membránovými transportéry (Gambini et al., 2015). V tlustém střevu je střevní mikrobiom schopen metabolizovat resveratrol a ovlivňovat jeho fyziologii účinků. Zároveň ovlivňuje druhy produkovaných metabolitů. Například rod *Bacteroides* spp. je schopen metabolizovat resveratrol na dihydroresveratrol (Bird et al., 2017). V krvi se resveratrol nachází ve třech různých formách – glukuronid, sulfát nebo volný. Volná forma může být navázána na albumin a lipoproteiny (Gambini et al., 2015). Konjugované formy na střevním epitelu zahrnují glukuronidované metabolity, jako resveratrol-3-O-glukuronid

a resveratrol-4'-O-glukuronid. V případě sulfátů, které jsou primárními metabolity, je to resveratrol-3-O-sulfát, dále resveratrol-4'-O-sulfát a resveratrol-3-O-4'-O-disulfát (Guthrie et al., 2017). Glukoronidace *cis*- formy je rychlejší (5-10krát) než *trans*-forma, což vede k nižší biologické dostupnosti *cis*-formy. Další, II. fáze metabolismu resveratrolu nebo jeho metabolitů probíhá v játrech. Díky enterohepatálnímu oběhu žluči se může resveratrol nebo jeho derivát navrátit do tenkého střeva se zachováním určité biologické aktivity (Gambini et al., 2015). Ostatní se vyloučí močí či stolicí. Metabolity II fáze biotransformace jsou především resveratrol-3-sulfát a resveratrol-3-glukuronid (Hu et al., 2017).

Z důvodu vyšší biologické aktivity *trans*-resveratrolu je mnoho studií zaměřeno právě na jeho účinky (Chedea et al., 2017). *Trans*-resveratrol je spojován často s „francouzským paradoxem“, protože jeho denní spotřeba, např. ve formě červeného vína (koncentrace v rozmezí 1,5-3 mg), má příznivé antioxidační účinky a hrají roli v prevenci srdečních onemocnění (Singh et al., 2008). Kromě těchto účinků resveratrolu na kardiovaskulární onemocnění několik dalších studií popisuje jeho schopnost zmírnit zánět, oxidační stres a dokonce byl navržen pro prevenci rakoviny (Chedea et al., 2017). S ohledem na účinnost na prevenci rakoviny, dokáže inhibovat různé metabolické enzymy cytochromu P450 a tím snížit zatížení potenciálně toxických metabolitů. Na druhou stranu inhibice aktivity cytochromu P450 může vést ke změně farmakokinetik (absorpci a dispozici) souběžně podávaných léčiv a vést k nežádoucím účinkům (Detampel et al., 2012). Klinické údaje také naznačují, že protizánětlivé a analgetické účinky *trans*-resveratrolu mohou být použity jako doplňková léčba pro onemocnění kloubů (Nguyen et al., 2017). Dále také chrání před diabetem II. typu a neurodegenerativními onemocněními (Donnez et al., 2009). Naopak při použití vysokých dávek (> 1 g) byly pozorovány poruchy zažívacího traktu včetně průjmů, bolesti břicha, nauzee, plynatosti a vysoké hladina bilirubinu (Chedea et al., 2017).

4 Materiály a metody

4.1 Materiál

Byly použity dva bakteriální kmeny, získané z České sbírky mikroorganismů: *Lactobacillus brevis* (CCM 3805; lidská stolice) a *Lactobacillus gaserri* (DSMZ 20243; lidský kmen). Buněčná kultura Caco-2 získaná z American Type Tissue Collection (Rockville, Maryland, USA) a HT29-MTX od společnosti Sigma-Aldrich (Praha, CZ).

Chlorid draselný (KCl), dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4), hydrogenuhličitan sodný (NaHCO_3), chlorid sodný (NaCl), hexahydrát chloridu hořečnatého ($\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$), uhličitan amonný ($(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$), hydrát chloridu vápenatého ($\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$), kyselina chlorovodíková (HCl) a hydroxid sodný (NaOH), vše od Lach-Ner (ČR). Pepsin, pankreatin, žluč, fosfátový pufr (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline DPBS), Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM/F12), fetální bovinní sérum (FBS), neesenciální aminokyseliny, penicilin, streptomycin, fosfátový pufr (PBS), Wilkins-Chalgren agar, resveratrol, dimethylsulfoxid (DMSO) a Triton-X100 od Sigma-Aldrich (USA). Propidium iodid zakoupen od Thermo Fischer Scientific (USA), bujon Wilkins Chalgren a Rogosa agar od Oxoid (UK).

Dále byly použity Reader infinite M200 (Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria), vodní lázeň (Schoeller Instruments, ČR), vodní lázeň (Huber Kältemaschinenbau AG, DE), termostat (Schoeller Instruments, ČR), centrifuga (Universal 320, Schoeller Instruments, ČR), analytické váhy Practum 213-1S (Sartorius, Německo), laboratorní míchačka Vortex (IKA[®], DE), souprava na čištění vody (Merck Millipore, USA). Kultivační láhve, serologické pipety, 24-jamkové kultivační destičky a 96-ti jamkové kultivační destičky, Petriho misky byly pořízeny od ThermoFisher (UK)

4.2 Metodika

4.2.1 Příprava bakteriální suspenze

Bakterie byly přes noc uchovány ve Wilkins-Chalgren bujónu při 37°C za anaerobních podmínek. Poté byly centrifugovány (2000 rpm, 10 minut), třikrát promyty fosfátovým pufrem PBS a resuspendovány v PBS při koncentraci 10^8 KTJ/ml, stanovené z jejich optické hustoty při 600 nm, na Tecan Infinite M200.

4.2.2 *In vitro* trávení

4.2.2.1 Příprava roztoků trávicích šťáv

Simulovaná žaludeční šťáva (SGF) a simulovaná střevní šťáva (SIF) byly připraveny ze zásobních roztoků elektrolytů podle tabulky 2. Roztoky byly připraveny vždy čerstvé maximálně 24 hodin před *in vitro* trávením.

Tabulka č. 2: Složení a hodnoty koncentrací simulovaných trávicích šťáv

Chemikálie	Koncentrace zásobního roztoku	Výsledná koncentrace soli v SGF	Výsledná koncentrace soli v SIF
	mol/l	mmol/l	mmol/l
KCl	0,5	6,9	6,8
KH ₂ PO ₄	0,5	0,9	0,8
NaHCO ₃	1	25	85
NaCl	2	47,2	38,4
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	0,15	0,12	0,33
(NH ₄) ₂ CO ₃	0,5	0,5	-

4.2.2.2 *In vitro* trávení

Bakterie byly podrobeny *in vitro* trávení ve dvou krocích – žaludeční a střevní fázi. V žaludeční fázi byl enzym pepsin (2000 U/ml ve výsledném roztoku) rozpuštěn v SGF a 0,3M CaCl₂ x H₂O (0,075 mM ve výsledném roztoku) a smíchán s bakteriální suspenzí o koncentraci 10⁸ KTJ/ml v poměru 1:1. Pomocí 1M HCl byl roztok upraven na pH 3. Vzorky byly umístěny do vodní lázně (37°C), za stálého třepání (100 rpm), po dobu dvou hodin.

Střevní fáze byla připravena rozpuštěním 20mM žluči (10mM ve výsledném roztoku) a enzymu pankreatinu (100 U/ml ve výsledném roztoku) v příslušných objemech a smícháním s SIF a 0,3M CaCl₂ x H₂O (0,3 mM ve výsledném roztoku). Po přidání žaludeční fáze v poměru 1:1 byly vzorky upraveny pomocí 1M NaOH na pH 7 a umístěny do vodní lázně (37°C), za stálého třepání (100 rpm), po dobu dvou hodin.

4.2.2.3 Měření životaschopnosti laktobacilů pomocí fluorescence

Měření fluorescence bylo provedeno za pomoci fluorescenčního barviva, barvicího DNA mrtvých buněk, propidium iodid. Pro získání celkového počtu buněk byla odebrána část vzorku před a po simulaci *in vitro* trávení a bakterie byly usmrceny (75 °C, 15 min.). Rozdíl

celkového počtu buněk a počtu mrtvých buněk dal celkový počet živých. Životaschopnost buněk byla zjištěna porovnáním počtu živých buněk před a po simulaci *in vitro* trávení.

Na mikrotitrační destičku bylo napipetováno 100 μ l vzorku s 10 μ l propidium iodidu (10 nM) a následně byl vzorek řádně protřepán a inkubován ve tmě v termostatu (37 °C, 30 min). Poté byla změřena fluorescence pomocí Reader infinite M200 (535 nm / 600 nm).

4.2.3 Test adherence

4.2.3.1 Kultivace tkáně

Buněčné linie kolorektálního adenokarcinomu Caco-2 a HT29-MTX byly kultivovány v kultivačních lahvích, o velikosti 75 cm², v 15 ml DMEM media, které bylo obohaceno 10% FBS, 1 % hydrogenuhličitanu sodného, 1 % pyruvátu sodného, 1 % neesenciálních aminokyselin, 1 % penicilinu a streptomycinu, a to po dobu 7 dní, kdy každý druhý den bylo toto medium vyměněno za čerstvé. Po sedmi dnech byly buněčné linie sklizeny. V prvním kroku byly buňky opláchnuty 5 ml PBS, které bylo následně odstraněno. Poté bylo k buňkám přidáno 5 ml 1 \times trypsinu, který byl nechán působit po dobu 3-5 minut. Po uplynutí této doby byl triton zneutralizován, a to přidáním 1 ml DMEM media. Pomocí plastové škrabky byly buněčné linie uvolněny a obsah lahve byl přenesen do 15 ml zkumavky typu Falcon a centrifugován při 200 \times g po dobu 10 minut. Staré medium bylo odstraněno a bylo přidáno medium nové v objemu 5 ml, ve kterém byly buňky rozpuštěny. Do nové kultivační lahve bylo připraveno 15 ml DMEM media. Ze zkumavky byl odebrán 1 ml suspenze a přenesen do této nové kultivační lahve. Kultivační láhev byla umístěna do CO₂ inkubátoru (37 °C a 5% CO₂ atmosféra).

4.2.3.2 Založení 24-jamkové destičky

Z buněčné suspenze, která byla důkladně rozpuštěna, bylo odebráno 100 μ l, smícháno se 100 μ l tripanové modře a následně byla odebrána kapka a byla dána na Bürkerovu komůrku. V 1 ml suspenze byl spočítán obsah buněk. Dle výpočtu byla zjištěna přesná koncentrace sklizených buněk. Do směsi bylo přidáno $3,6 \times 10^4$ Caco-2 a $0,4 \times 10^4$ HT29-MTX. Tato směs byla pipetována na jamku v objemu 500 μ l a takto připravená destička byla uložena v kultivačním boxu. Po dobu 14 dní bylo každé 2 – 3 dny vyměněno medium za čerstvé. Po 14 dnech by měla proběhnout plná diferenciací buněk a také by mělo dojít k plné konflucenci monovrstvy.

4.2.3.3 Příprava resveratrolu

Zásobní roztok o koncentraci 10 mg/ml byl připraven v DMSO. Před testem adherence byl připraven pracovní roztok resveratrolu v DMEM, bez přísad, v koncentracích 5; 2,5 a 1,25 µg/ml.

4.2.3.4 Test adherence

Pro tento test byla modifikována metodika dle Jensen et al. (2012). Staré medium bylo odsáto a buněčná monovrstva byla 3× promyta PBS. Poté bylo na monovrstvu přidáno 900 µl roztoku resveratrolu (v koncentraci 5, 2,5 a 1,25 µl/ml) nebo čistého média pro kontrolu a 100 µl bakteriální suspenze. Výsledná koncentrace resveratrolu byla 4,5; 2,25 a 1,125 µl/ml. Pro každou bakterii a koncentraci bylo připraveno šest opakování a destičky se dále inkubovaly po dobu 2 hodin, při 37 °C a v 5% atmosféře CO₂. Po uplynutí této doby byly jamky 3× promyty PBS, pro odstranění neadherovaných bakterií na monovrstvu, která byla následně rozrušena přidáním 300 µl 1% Tritonu-X100 na jamku po dobu 30 s a dále doplněny 700 µl PBS. Vytvořená suspenze s životaschopnými bakteriemi byla zředěna a poté naočkována na Petriho misky a zalita Rogosa agarem. Po 72 hodinách inkubace za aerobních podmínek a při 37 °C byly spočítány KTJ a byla stanovena adherence, vyjádřená jako procento adhereovaných bakterií na množství celkově přidávaných bakterií.

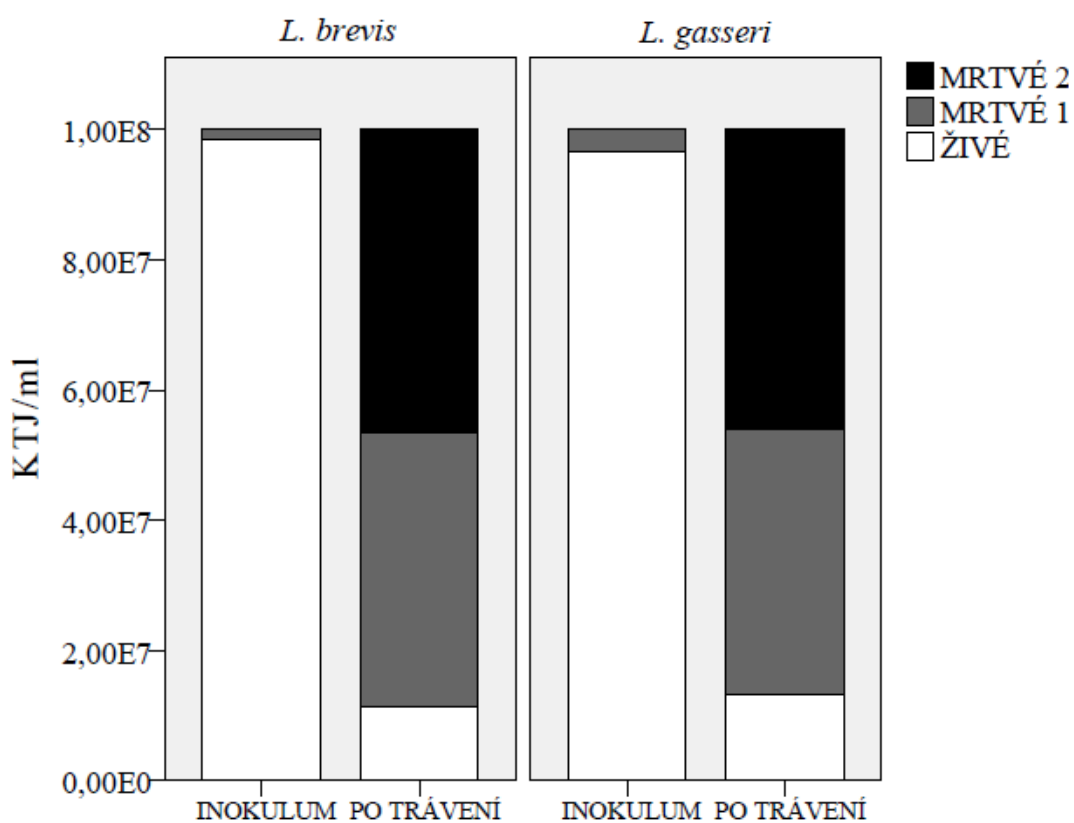
4.3 Statistické vyhodnocení

K vyhodnocení statistického vlivu *in vitro* trávení na vybrané druhy bakterií byl použit t-test a pro vyhodnocení vlivu resveratrolu na adhezi bakterií byla použita analýza rozptylu (ANOVA, $p < 0,05$), pomocí programu Statistica 12. Data byla vyjádřena jako průměr ± směrodatná chyba průměru a pro porovnání byl použit Scheffého test.

5 Výsledky

5.1 *In vitro* trávení

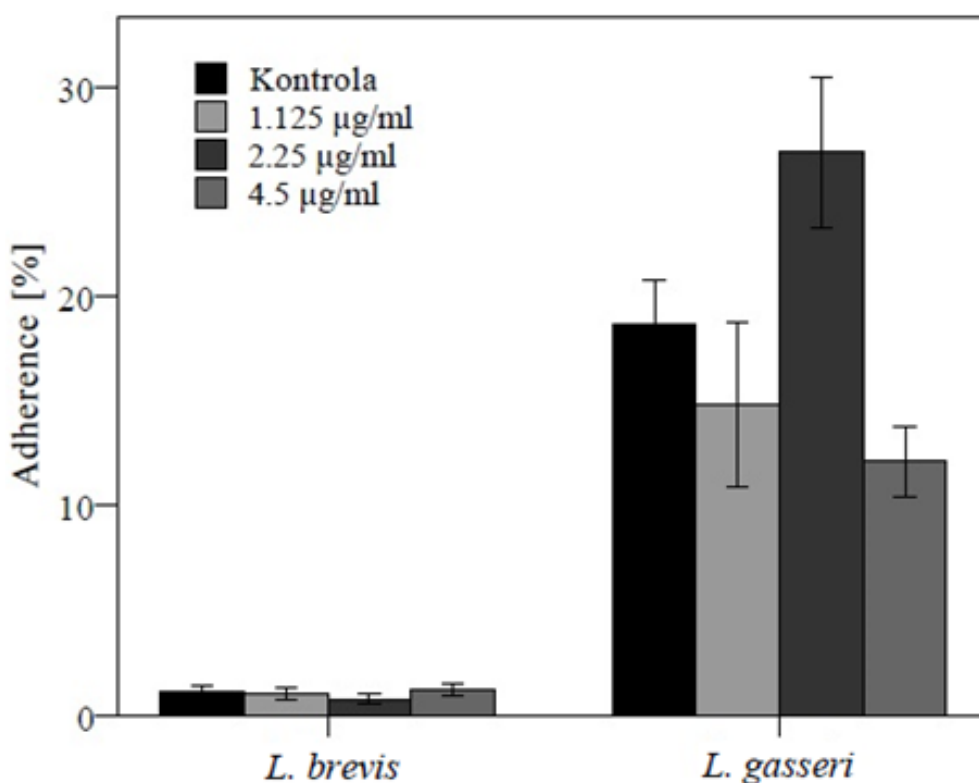
Byly testovány vybrané kmeny laktobacilů na schopnost přežití průchodem přes trávicí trakt. Počáteční koncentrace činila 10^8 KTJ/ml, výsledná životaschopnost po simulaci byla pouze 12,76 % u *L. brevis*. U *L. gasseri* byla zaznamenána vyšší životaschopnost a to 14,76 % jak je vidět v grafu 1. Životaschopnost obou bakterií byla tak po průchodu *in vitro* trávicím modelem významně snížena ($p < 0,05$). Tento graf mimoto ukazuje i mrtvé bakterie 2, které jsou nedekovatelné buňky při měření fluorescence.



Graf 1: Životaschopnost (KTJ / ml) bakteriální suspenze *L. brevis* a *L. gasseri* po průchodu *in vitro* modelem trávicího traktu, zahrnující žaludeční a střevní část. Měřeno fluorescence (535 nm / 600 nm) po barvení DNA mrtvých buněk propidium iodidem. Mrtvé bakterie 2 zahrnují nedekovatelné buňky při měření.

5.2 Adherence

Testována byla adherence za přítomnosti resveratrolu na směsné kultuře buněčných linií Caco-2 a HT29-MTX. Ve schopnosti adherence testovaných kmenů byly významné rozdíly (Graf 2). U *L. gasseri* s počáteční koncentrací 10^7 KTJ / ml byla potvrzena vysoká schopnost adherovat. Průměrná adherence bez přidání resveratrolu byla 18,69 %. Po přidání resveratrolu, byla nejvyšší adherence zaznamenána při koncentraci 2,25 $\mu\text{g/ml}$ (28 %). Ostatní koncentrace, tedy 1,125 a 4,5 $\mu\text{g/ml}$, schopnost adherence naopak snižovaly (o 2 %, respektive o 8 %). *L. brevis* s počáteční koncentrací 10^7 KTJ / ml naopak v kontrole, bez přidání resveratrolu, vykazoval velmi nízkou adherenci s průměrnou hodnotou 1,09 %. Po přidání resveratrolu však jeho schopnost adherence nepřesáhla 1,1 % u žádné z koncentrací. Vliv resveratrolu u žádné z bakterií nebyl statisticky významný na hladině významnosti ($p < 0,05$). To může být mimo jiné způsobeno i vysokou variabilitou výsledků mezi jednotlivými měřeními.



Graf 2: Vliv resveratrolu (v koncentraci 4,5; 2,25 a 1,125 $\mu\text{g/ml}$) na adherenci *L. brevis* a *L. gasseri* na buněčných liniích kolorektálního karcinomu Caco-2 a HT29-MTX, použitých jako *in vitro* model sliznice tlustého střeva. Výsledky vyjádřeny jako průměr \pm standardní chyba

6 Diskuze

Probiotika jsou mikroorganismy, které při konzumaci v dostatečném množství vykazují příznivé účinky na lidské zdraví. Zdravotní účinky probiotických bakterií jsou specifické pro kmen, a proto je jejich rozlišení a identifikace velmi důležitá a rozhodující při výběru probiotika (Haghshenas et al., 2016). Komerční zájem o funkční potraviny obsahující probiotické kmeny se neustále zvyšuje kvůli povědomí o přínosech pro zdraví střev a prevenci onemocnění. Aby mohly být probiotické bakterie účinné, je zapotřebí jejich přežití v prostředí gastrointestinálního traktu. Schopnost probiotických kmenů přežít průchod traktem je způsobena především tolerancí vůči kyselému prostředí a žlučovým solím. Jedná se o vnitřní charakteristiky kmene, které lze zlepšit ochranným účinkem nosičů nebo přítomností živin, jako jsou metabolizovatelné cukry. Ukázalo se, že asi 10 % až 30 % probiotik obecně přežije, variabilita závisí na řadě faktorů, jako je typ probiotik nebo na složení potravní matrice (Lo Curto et al., 2011). S touto studií se shodují výsledky této práce, kde životaschopnost bakterií byla mírně pod 15 %.

Výběr matrice se objevuje jako rozhodujícím krokem k účinné ochraně probiotik, dokud nedosáhnou tlustého střeva. Dobrá matrice by měla nejprve chránit bakterie během zpracování a skladování, poté musí chránit bakterie během žaludečního trávení a uvolnění bakterií ve střevě v intaktním stavu. Jsou-li volné bakterie inkubovány v simulované žaludeční tekutině, při pH simulujícím žaludek, je pozorována vysoká ztráta bakteriální životaschopnosti (Guerin et al. 2017). Čisté bakteriální kultury budou tedy pravděpodobně více vystaveny těžkým stavům během trávení než bakterie obsažené v potravinách (Faye et al. 2012). V této práci byly testovány bakterie jako součást bakteriální suspenze. Tato forma mohla tedy výrazně ovlivnit nízkou životaschopnost bakterií a použití jiné formy matrice by mohlo vést ke změně výsledků u obou kmenů *L. gasseri* i *L. brevis*.

Množství potřebné pro získání jakýchkoli terapeutických přínosů je minimálně 10^6 životaschopných probiotických buněk na mililitr během skladování do data expirace. Většina studií hodnotících rezistenci potenciálních probiotických kmenů na sekreci žaludku a žluči byla provedena pomocí *in vitro* testu. I přes to nebyly pozorovány žádné významné rozdíly mezi *in vitro* a *in vivo* pozorováními, způsobenými komplexní povahou lidského systému, a metoda *in vitro* se jeví jako vhodný model pro přežití bakterií (Sahadeva et al. 2011).

Ačkoliv pH v žaludku je vyšší (pH 4-6) při příjmu potravy, v závislosti na kapacitě pufovacího účinku, obecně se po určité době stabilizuje na 2,5 až 3,5. Proto *in vitro* simulace

žaludečního trávení probíhala při pH 3. Poté bakterie musí přežít účinky žlučových solí a proteáz dvanáctníku. Faye et al. (2012) porovnávali přežití laktobacilů pomocí standartních testů acidity a tolerance vůči žluči a lidského modelu se žaludeční a střevní šťávou, které prokázaly vyšší životaschopnost *L. paracasei*. Z původní koncentrace 10^7 KTJ / ml byly jejich počty sníženy na přibližně 10^4 KTJ / ml při testech acidity (3 hodiny, pH 3), zatímco po trávení byla jejich koncentrace snížena na 10^6 KTJ / ml, bez ohledu na matrici. Po simulaci trávení *L. paracasei* přežil lépe jako čistá kultura, než jako součást fermentovaného mléka. Tím se tyto výsledky lišily od jiných publikací, kde potvrzovaly vyšší životaschopnost bakterií jako součást potravinářské matrice. Studie Pitino et al. (2010) zkoumala životaschopnost kmenů *L. rhamnosus* za simulace dynamického *in vitro* modelu horního gastrointestinálního traktu. Bakteriální koncentrace *L. rhamnosus* GG se snížila přibližně na 63 % své počáteční hodnoty. Životaschopnost bakterie byla poměrně vysoká, obzvláště oproti výsledkům této práce (*L. brevis* 12,76% a *L. gasseri* 14,76 %), ale je důležité zmínit, že byla trávena jako součást sýrové matrice. Marteau et al. (1997) testovali životaschopnost kmenů laktobacilů, které byly součástí jogurtů. Po střevní části byly hodnoty jednoho výrobku výrazně nižší u *L. bulgaricus* (26 %). U *L. acidophilus* byla hodnota z původního množství snížena na 64 %. Průchod tenkým střevem s fyziologickými koncentracemi žluči vedl ke snížení životaschopnosti u všech druhů testovaných bakterií. Pokud došlo ke snížení koncentrace žluči, byla životaschopnost *L. acidophilus* o něco zvýšena, na rozdíl od *L. bulgaricus* (pravděpodobně kvůli nízké životaschopnosti za obou podmínek).

Studie Ashraf et Smith (2015) byla zaměřena na posouzení variability probiotických kmenů, pokud jde o toleranci na simulovanou žaludeční šťávu a žlučové soli za podmínek, které napodobují prostředí gastrointestinálního traktu u člověka. Z kmenů laktobacilů *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. thermophilus*, *L. casei*, a *L. plantarum* prokázaly přežití o více než 50 % a udržovaly životaschopnost během 3-hodinové expozice pepsinu, při pH 2 a jsou považovány tolerantní vůči průchodu žaludkem. *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a *L. plantarum* udržely životaschopnost po expozici 0,5% a 2% (s výjimkou *L. plantarum*) žluči po dobu 12 hodin. *L. paracasei* a *L. salivarius* vykazovaly významné snížení životaschopnosti při 0,5% koncentraci žluči, ale obnovila se životaschopnost po 12 hodinách při vyšší koncentraci žluči (2 %). U některých kmenů, jako je *L. rhamnosus* a *L. acidophilus* nedošlo téměř ke změnám v chování ke zvýšení koncentrace žluče. Lze tedy říci, že všechny testované kmeny jsou tolerantní ke kyselému prostředí, i ke žluči (> 92% přežití v pepsinu pH 3 po dobu 3 hodin, > 60% přežití na 0,5% žluči po dobu 12 hodin) kromě *L. paracasei*.

L. reuteri, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* a *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* se ukázaly jako vysoce tolerantní ke gastrointestinálním stresům mezi testovanými kmeny (Ashraf et Smith, 2015). Protonovaná (nedisociovaná) forma žlučových solí způsobuje disociaci lipidové dvojvrstvy a integrálního proteinu buněčných membrán, což vede k úniku bakteriálního obsahu a nakonec ke smrti buněk. Tolerance žlučových solí souvisí s aktivitou žlučové soli hydrolázy, která hydrolyzuje konjugovanou žluč, čímž minimalizuje její baktericidní účinek na kmeny (Moser et Savage, 2001). Kyselé prostředí žaludku a žlučové soli tedy ovlivňují životaschopnost bakterií, ale do jaké míry závisí z velké části i na tom, jaký bakteriální kmen je použit.

Aby mohly probiotické bakterie být kolonizovány ve střevě a nebyly odstraněny střevní peristaltikou, musí adherovat ke střevní sliznici (Haghshenas et al., 2016). Tato schopnost je považována za další a jednu z hlavních kritérií pro výběr potenciálních probiotik, protože zvyšuje jejich stálost ve střevě a umožňuje tak zdravotní účinnost. Mezi nejčastěji používané probiotika patří kmeny *Lactobacillus* (WHO, 2002). Vzhledem k obtížnosti stanovení adherence bakterií *in vivo* byla tato schopnost studována za použití střevních buněčných linií lidského původu v kultuře jako *in vitro* model střevního epitelu. V této práci byla použita směsná kultura Caco 2 a HT29-MTX díky lepší simulaci sliznice střevního epitelu, vylučující mucin.

Studie Haghshenas et al. (2016) zkoumala schopnost některých probiotik adherovat k buňkám Caco-2. Jedním z kmenů s vysokou adhezivní schopností byl *L. plantarum* (3,2 a 2,6 % adheze) a v rámci studie bylo prokázáno, že tento izolát byl zároveň jeden z nejrezistentnějších kmenů vůči gastrointestinálnímu trávení a je schopen adherovat lépe než jiné laktobacily (1,6 – 1,8 %). *L. gasseri* použitý v této práci vykazoval tedy vysokou adhezní schopnost (18,69 %).

I přes to, že přesný mechanismus vlivu fenolových sloučenin na adherenci mikrobiomu není ještě zcela pochopen, byla již vyslovena hypotéza, že na adhezi bakterií k epiteliálním buňkám tlustého střeva se podílí proteinové sloučeniny bakterií. Studie ukázaly, že povrchové proteiny některých laktobacilů se účastní adheze k epiteliálním buněčným liniím, hlenu gastrointestinálního traktu nebo proteinům extracelulárního matrixu (Granato et al., 2004). Devět kmenů laktobacilů bylo testováno na schopnost adherence k buňkám HT-29. Byly extrahovány proteiny buněčného povrchu, které se podílely na adhezi laktobacilů k buňkám HT-29. Bylo prokázáno (Wang et al., 2008), že schopnost laktobacilů adherovat k buňkám HT-29 *in vitro* se mezi jednotlivými kmeny značně lišila. Nejvíce adhezivním kmenem byl *L. reuteri* s 21,30 %. *L. gasseri* adheroval z 12,05 %, tedy pouze

o necelých 7 % méně než v této práci za použití kultury Caco 2 a HT29-MTX. *L. brevis* adheroval z pouhých 3,57 %, tedy i tento výsledek byl podobný výsledkům této práce (*L. brevis* 1,09 %). Bylo prokázáno, že *L. acidophilus* a *L. casei* vykazují menší adhezi k buňkám Caco-2, ale lepší schopnost adheze při použití monovrstev buněk HT-29. Adhezní schopnosti zkoumaných laktobacilů prokázaly variabilitu mezi kmeny, s výjimkou *L. acidophilus* a *L. casei*, u nichž nebyly mezi nimi žádné významné rozdíly. V této studii byl především *L. plantarum* velmi dobře adherujícím kmenem k buňkám Caco-2 ve srovnání s *L. acidophilus*, o kterém bylo dříve prokázáno, že má významné adhezní schopnosti (Palencia et al., 2008). Vliv na vysokou schopnost adherence *L. plantarum* může být způsobena nalezenými proteiny sekretovanými tímto kmenem, ale zároveň tuto schopnost může podporovat hydrofobicita bakterie (Sánchez et al., 2009).

Vedle interakcí mezi hostitelem a bakteriemi a střevními bakteriemi navzájem má velmi silný vliv na modulaci střevního mikrobiomu alimentární příjem některých složek potravin. Proto je důležité zvážit, zda příjem těchto složek může ovlivnit kolonizaci intestinálními mikroorganismy (Toivanen et al., 2011). Úloha fenolových sloučenin v působení na lidské zdraví závisí do značné míry na jejich biologické dostupnosti, absorpci a metabolismu. Odhaduje se, že pouze 5 % až 10 % celkového příjmu fenolových sloučenin by mohlo být absorbováno v tenkém střevě, zatímco 90 % až 95 % se dostane do tlustého střeva, kde jsou tyto látky transformovány mikrobiomem na biologicky dostupné metabolity, které mohou být ještě více bioaktivní než jejich prekurzory. Je známo, že nejen metabolismus fenolových sloučenin se podílí na intestinálním mikrobiomu, ale také fenolové sloučeniny a jejich mikrobiální metabolity mohou mít jako prebiotikum vliv na mikrobiom tlustého střeva a vyvolat účinky (Cueva et al., 2017). Např. resveratrol, silný antioxidant nalezený ve víně, může podporovat nárůst počtů bakterií *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* (Laparra et al., 2010). Fenolové sloučeniny a probiotické bakterie prokázaly vzájemnou interakci, pokud koexistují v potravinách, doplňcích stravy nebo v gastrointestinálním traktu. Adherence mikroorganismů ke střevní sliznici je důležitá pro dobu pobytu v gastrointestinálním traktu a souvisí se schopností bakteriálního kmenu příznivě ovlivnit zdraví hostitele tím, že produkují antimikrobiální metabolity, modulují imunitní i neimunitní obranné mechanismy a soutěží o živiny a prostor a tím mohou vyloučit konkurenční patogen. Zvýšení adherence probiotických bakterií by tak mohlo pomoci obnovit rovnováhu střevního mikrobiomu (Bustos et al. 2012; Duda-Chodak et al., 2008).

Studie Celebioglu et al. (2018) vybrala pět rostlinných fenolových sloučenin, aby zjistila jejich vliv na široce využívanou probiotickou bakterii *L. acidophilus* NCFM. Jedná se

o gram-pozitivní, homofermentativní bakterii, která se nachází v gastrointestinálním traktu a je využívána nejen v mléčných výrobcích, kde vykazuje vynikající stabilitu, ale i ve výživových doplncích. Studie byla prováděna na buňkách HT-29. Adhezivní schopnost *L. acidophilus* NCFM se lišila podle výběru fenolové sloučeniny. Např. resveratrol (100 µg/ml) významně zvýšil adhezi (o 2,4 násobek) k buňkám, oproti kávové nebo ferulové kyselině, která adhezenci naopak snížila. Přítomnost ani jedné fenolové sloučeniny ve všech dávkách však neinhibovala růst buněk bakterie. Skutečnost, že na schopnosti adherovat ke střevním epiteliálním buňkám závisí také na příslušné fenolové sloučenině, podpořila i studie Peres et al. (2015), která zkoumala účinek dvou fenolových sloučenin (oleuropeinu a hydroxytyrosolu) na adhezenci *L. plantarum* na Caco-2. V případě použití oleuropeinu schopnost adherence výrazně poklesla, zatímco v případě použití hydroxytyrosolu se adherence zvýšila. Studie Volstatova et al. (2017) se zaměřila na zkoumání vlivu jablečných extraktů (dužiny a slupky) a jejich fenolových složek na adhezi dvou kmenů laktobacilů na intestinální epiteliální buňky Caco-2 a HT29-MTX. Výtažky z jablečné slupky snížili adhezi *L. gasseri* (o 39,7 % a 45,9 %) i *L. casei* (o 6,8 % a 19,4 %), výtažek z dužiny tuto schopnost zvýšil o 35,7 % u *L. gasseri* a 28,2 % *L. casei*. Bustos et al. (2012) sledovali vliv flavan-3-olu na adhezi bakterií. Účinek různých flavan-3-ol sloučenin na adhezi bakterií se lišil v závislosti jak na kmeni laktobacilu, tak na testované buněčné linii. Většina testovaných fenolových sloučenin flavan-3-olu vykazovala inhibiční účinek na adhezi laktobacilů na buňky HT-29. U *L. acidophilus* docházelo i k inhibici na Caco-2 s výjimkou přidání epigallokatechingallátu, který zvýšil adhezi *L. acidophilus* o 31 %. Přidání procyanidinu ale pozoruhodně zvýšilo adhezi *L. casei* na buněčné linii HT-29. Některé běžně přijímané flavan-3-oly tedy mají potenciál měnit střevní mikrobiom modifikací adheze probiotických kmenů *Lactobacillus* na střevní buňky. Nelze však určit vztah mezi chemickou strukturou flavan-3-olů a jejich účinkem na adhezi bakterií na testované buněčné linii. Fenolové sloučeniny jsou schopny interagovat s mikrobiálními membránovými bílkovinami, enzymy a lipidy, čímž se mění propustnost buněk a umožňuje ztrátě protonů, iontů a makromolekul (Bustos et al., 2012).

Fenolové sloučeniny ovlivňují životaschopnost střevního mikrobiomu *in vitro*, a to v množstvích, které se pravděpodobně vyskytují v gastrointestinálním traktu. Neexistuje tedy ale žádný zřejmý vztah mezi strukturou a aktivitou vzhledem k polaritě, glykosylaci nebo třídě fenolové sloučeniny a jejich vlivu na bakteriální adhezi k buňkám Caco-2. Mechanismus, kterým tyto sloučeniny ovlivňují adhezi bakterií na střevní buňky, není dosud plně pochopen. Zvýšená adherence probiotik pomáhá při udržování obranyschopnosti sliznice

střeva. Některé fenolové sloučeniny, jako je floridzin nebo rutin, inhibují růst a adhezi střevních patogenů na střevní buňky a zvyšují proliferaci a adhezi probiotika *L. rhamnosus* (Parkar et al. 2008).

Vzhledem k tomu, že všechny tyto výsledky publikované literatury byly podobné v adhezenci bakterií bez přidání fenolové sloučeniny a lišily se pouze podle použitého kmenu a v malých hodnotách podle použité buněčné kultury, účinky vzájemného působení mezi fenolovými sloučeninami a střevním mikrobiomem zůstávají do značné míry neznámé. Výsledky se liší podle použitého kmene i použité fenolové sloučeniny a je potřeba dalších studií. Lze však říci, že přítomnost resveratrolu nemá vliv na adhezi kmenů *L. gasseri* a *L. brevis*.

7 Závěr

Dysbióza střevního mikrobiomu je považována za možnou příčinu intestinálních, metabolických a autoimunitních onemocnění, a proto v dnešní době roste zájem o účinná probiotika, která mohou těmto stavům předcházet nebo je léčit. I když je důležité mít na paměti, že podmínky *in vivo* je obtížné přetvářet na *in vitro* modely z důvodu velmi dynamického prostředí gastrointestinálního traktu, *in vitro* experimenty jsou nezbytné pro pochopení mechanismů trávení i adheze a poskytují důležité informace. Jelikož pro výběr kmenů probiotik je důležitým kritériem přežití průchodu gastrointestinálním traktem, je třeba dalších výzkumů jednotlivých kmenů, jak na tento proces reagují, aby se mohla zlepšit jejich životaschopnost a tím i účinnost. Stejně tak u schopnosti adherence, která je druhým důležitým kritériem pro výběr probiotik, bylo prokázáno, že závisí na mnoha faktorech, jako je bakteriální kmen, použití buněčné linie, či některé funkční složky potravy. I to se může měnit v závislosti na střevním mikrobiomu z jednoho jedince na druhého. Proto jsou pokroky ve znalostech o interakcích mezi bioaktivními potravinovými sloučeninami a specifickými intestinálními bakteriemi důležité pro lepší pochopení pozitivních i negativních účinků a identifikaci funkčních mikroorganismů obývajících náš trávicí trakt.

Laktobacillus gasseri i *Latobacillus brevis* prokázaly podobnou a poměrně nízkou životaschopnost pod 15 % po průchodu *in vitro* modelem trávicího traktu. Zároveň z výsledků této práce vyplývá, že resveratrol nemá statisticky významný vliv na adherenci na směsné kultuře Caco-2 a HT29-MTX ani na jeden z obou vybraných druhů laktobacilů. Tento výsledek se často neshoduje s publikovanou literaturou, což nás dovádí k závěru, že je zde množství faktorů, jako je bakteriální kmen, matrice nebo konkrétní fenolová sloučeniny, které ovlivňují adherenci latobacilu. Avšak nejvýznamnějším faktorem bude pravděpodobně použitý buněčný model, kdy buněčná linie HT29-MTX produkuje převahu mucinu typu MUC5 a ne MUC 2, na který běžně adherují laktobacily. Z tohoto důvodu je běžně v literatuře uváděna vyšší adheze na buněčnou linie HT29, která produkuje minimum mucinu tím mohou bakterie snáze adherovat na tuto buněčnou linii.

8 Seznam použité literatury

- Acosta-Estrada, B. A., Gutiérrez-Urbe, J. A., Serena-Saldívar, S. O. 2014. Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*. 152. 46 – 55.
- Almaas, H., Cases, A. L., Devold, T. G., Holm, H., Langsrud, T., Aabakken, L., Aadnoey, T., Vegarud, G. E. 2006. *In vitro* digestion of bovine and caprine milk by human gastric and duodenal enzymes. *International Dairy Journal*. 16 (9). 961 – 968.
- Altemimi, A., Lakhssassi, N., Baharlouei, A., Watson, D. G., Lightfoot, D. A. 2017. Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. *Plants*. 6 (4). 42.
- Amarowicz, R., Carle R., Dongowski, G., Durazzo, A., Galensa, R., Kammerer, D., Maiani, G., Piskula, M. K. 2009. Influence of postharvest processing and storage on the content of phenolic acids and flavonoids in foods. *Molecular Nutrition and Food Research*. 53 (2). 151 – 183.
- Angelino, D., Cossu, M., Marti, A., Zanoletti, M., Chiavaroli, L., Brighenti, F., Del Rio, D., Martini, D. 2017. Bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in bread: a review. *Food & Function*. 8 (7). 2368 – 2393.
- Araújo, J. R., Tomas, J., Brenner, C., Sansonetti, P. J. 2017. Impact of high-fat diet on the intestinal microbiota and small intestinal physiology before and after the onset of obesity. *Biochemie*. 141. 97 – 106.
- Asahara, T., Shimizu, K., Nomoto, K., Hamabata, T., Ozawa, A., Takeda Y. 2004. Probiotic Bifidobacteria Protect Mice from Lethal Infection with Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157 : H7. *Infection and Immunity*. 72 (4). 2240 – 2247.
- Ashraf, R., Smith, S. C. 2016. Commercial lactic acid bacteria and probiotic strains-tolerance to bile, pepsin and antibiotics. *International Food Research Journal*. 23 (2). 777 – 789.
- Atuma, C., Strugala, V., Allen, A., Holm, L. 2001. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state *in vivo*. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 280 (5). 922 – 929.
- Babbar, N., Oberoi, H. S., Sandhu, S. K. 2015. Therapeutic and Nutraceutical Potential of Bioactive Compounds Extracted from Fruit Residues. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 55 (3). 319 – 337.
- Bäckhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A., Gordon, J. I. 2005. Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine. *Science*. 307 (5717). 1915 – 1920.

- Badholli-Salihi, M., Schuster, R., Mulla, D., Praznik, W., Viernstein, H., Mueller, M. 2016. Bioconversion of piceid to resveratrol by selected probiotic cell extracts. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 39 (12). 1879 – 1885.
- Baião, D. D. S., de Freitas, C. S., Gomes, L. P., da Silva, D., Correa, A. C. N. T. F., Pereira, P. R., Aguila, E. M. D., Paschoalin, V. M. F. 2017. Polyphenols from root, Tubercles and grains cropped in brazil: Chemical and nutritional characterization and their effects on human health and diseases. *Nutrients*. 9 (9). 1044.
- Bik, E. M., Eckburg, P. B., Gill, S. R., Nelson, K. E., Purdom, E. A., Francois, F., Perez-Perez, G., Blaser, M. J., Relman, D. A. 2006. Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103 (3). 732 – 737.
- Bird, J. K., Raederstorff, D., Weber, P., Steinert, R. E. 2017. Cardiovascular and Antiobesity Effects of Resveratrol Mediated through the Gut Microbiota. *Advances in Nutrition*. 8 (6). 839 – 849.
- Basholli-Salihi, M., Schuster, R., Mulla, D., Praznik, W., Viernstein, H., Mueller, M. 2016. Bioconversion of piceid to resveratrol by selected probiotic cell extracts. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 39 (12). 1879 – 1885.
- Blanquet-Diot, S., Soufi, M., Rambeau, M., Rock, E., Alric, M. 2009. Digestive Stability of Xanthophylls Exceeds That of Carotenes As Studied in a Dynamic *in Vitro* Gastrointestinal System. *Journal of Nutrition*. 139 (5). 876 – 883.
- Blutt, S. E., Broughman, J. R., Zou, W., Zeng, X. L., Karandikar, U. C., In, J., Zachos, N. C., Kovbasnjuk, O., Donowitz, M., Estes, M. K. 2017. Gastrointestinal microphysiological systems. *Experimental Biology and Medicine*. 242 (16). 1633 – 1642.
- Boisen, S., Eggum, B. O. 1991. Critical Evaluation of *in Vitro* Methods for Estimating Digestibility in Simple-Stomach Animals. *Nutrition Research Reviews*. 4(1). 141 – 162.
- Bornhorst, G. M., Gouseti, O., Wickham, M. S., Bakalis, S. 2016. Engineering Digestion: Multiscale Processes of Food Digestion. *Journal of Food Science*. 81 (3). 534 – 543.
- Bornstein, J. C. 2008. Purinergic mechanisms in the control of gastrointestinal motility. *Purinergic Signalling*. 4 (3). 197 – 212.

- Bouhnik, Y., Raskine, L., Simoneau, G., Vicaut, E., Neut, C., Flourié, B., Brouns, F., Bornet, F. R. 2004. The capacity of nondigestible carbohydrates to stimulate fecal bifidobacteria in healthy humans: A double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group, dose-response relation study. *American Journal of Clinical Nutrition*. 80 (6). 1658 – 1664.
- Bustos, I., García-Cayuela, T., Hernández-Ledesma, B., Peláez, C., Requena, T., Martínez-Cuesta, M. C. 2012. Effect of flavan-3-ols on the adhesion of potential probiotic lactobacilli to intestinal cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60 (36). 9082 – 9088.
- Cartea, M. E., Francisco, M., Soengas, P., Velasco, P. 2010. Phenolic compounds in Brassica vegetables. *Molecules*. 16 (1). 251 – 280.
- Cash, H. L., Whitham, C. V., Behrendt, C. L., Hooper, L. V. 2016. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science*. 313 (5790). 1126 – 1130.
- Celebioglu, H. U., Delsoglio, M., Brix, S., Pessione, E., Svensson, B. 2018. Plant Polyphenols Stimulate Adhesion to Intestinal Mucosa and Induce Proteome Changes in the Probiotic *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Molecular Nutrition & Food Research*. 62 (4). 11.
- Collado, M. C., Meriluoto, J., Salminen, S. 2007. Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus. *Letters in Applied Microbiology*. 45 (4). 454 – 460.
- Conlon, M. A., Bird, A. R. 2015. The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human health. *Nutrients*. 7 (1). 17 – 44.
- Cooper, D., Doucet, L., Pratt, M. 2007. Understanding ‘appropriateness’ in multinational organizations. *Journal of Organizational Behavior*. 28 (3). 303 – 325.
- Cueva, C., Gil-Sánchez, I., Ayuda-Durán, B., González-Manzano, S., González-Paramás, A. M., Santos-Buelga, C., Bartolomé, B., Moreno-Arribas, M. 2017. An integrated view of the effects of wine polyphenols and their relevant metabolites on gut and host health. *Molecules*. 22 (1). 15.
- Cueva, C., Moreno-Arribas, M. V., Martín-Alvarez, P. J., Bills, G., Vicente, M. F., Basilio, A., Rivas, C. L., Requena, T., Rodríguez, J. M., Bartolomé B. 2010. Research in Microbiology. 161 (5). 372 – 382.
- Daliri, E. B., Wei, S., Oh, D. H., Lee, B. H. 2016. The Human Microbiome and Metabolomics: Current Concepts and Applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 57 (16). 3565 – 3576.

- D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Scazzocchio, B., Masella, R. 2010. Bioavailability of the polyphenols: Status and controversies. *International Journal of Molecular Sciences*. 11 (4). 1321 – 1342.
- Dave, M., Higgins, P. D., Middha, S., Rioux, K. P. 2012. The human gut microbiome: Current knowledge, challenges, and future directions. *Translational Research*. 160 (4). 246 – 257.
- Deepika, G., Charalampopoulos, D. 2010. Surface and adhesion properties of lactobacilli. *Advances in Applied Microbiology*. 70. 127 – 152.
- De Preter, V., Hamer, H. M., Windey, K., Verbeke, K. 2011. The impact of pre- and/or probiotics on human colonic metabolism: Does it affect human health?. *Molecular Nutrition and Food Research*. 55 (1). 46 – 57.
- Derrien, M., van Passel, M. W. J., van de Bovenkamp, J. H. B., Schipper, R. G., de Vos, W. M., Dekker, J. 2010. Mucin-bacterial interactions in the human oral cavity and digestive tract. *Gut Microbes*. 1 (4). 254 – 268.
- Detampel, P., Beck, M., Krähenbühl, S., Huwyler, J. 2012. Drug interaction potential of resveratrol. *Drug Metabolism Reviews*. 44 (3). 253 – 265.
- Do, J., Zafar, H., Saier, M. H. 2017. Comparative genomics of transport proteins in probiotic and pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* strains', *Microbial Pathogenesis*. 107. 106 – 115.
- Donnez, D., Jeandet, P., Clément, C., Courot, E. 2009. Bioproduction of resveratrol and stilbene derivatives by plant cells and microorganisms. *Trends in Biotechnology*. 27 (12). 706 – 713.
- Duda-Chodak, A., Tarko, T., Statek, M. 2008. The effect of antioxidants on *Lactobacillus casei* cultures. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia*. 7 (4). 39 – 51.
- Dvorakova, M., Landa, P. 2017. Anti-inflammatory activity of natural stilbenoids: A review. *Pharmacological Research*. 124. 126 – 145.
- Eckuburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, Ch. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E., Relman, D. A. 2005. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science*. 308 (5728). 1635 – 1638.
- Espín, J. C., González-sarriás, A., Tomás-barberán, F. A. 2017. The gut microbiota: a key factor in the therapeutic effects of (poly)phenols. *Biochemical Pharmacology*. 139. 82 – 93.

- Faye, T., Tamburello, A., Vegarud, G. E., Skeie, S. 2012. Survival of lactic acid bacteria from fermented milks in an *in vitro* digestion model exploiting sequential incubation in human gastric and duodenum juice. *Journal of Dairy Science*. 95 (2). 558 – 566.
- Ferrua, M. J., Singh, R. P. 2010. Modeling the fluid dynamics in a human stomach to gain insight of food digestion. *Journal of Food Science*. 75 (7). 151 – 162.
- Foulke-abel, J., In, J., Kovbasnjuk, O., Zachos, N. C., Ettayebi, K., Blutt, S. E., Hyser, J. M., Zeng, X. L., Crawford, S. E., Broughman, J. R., Estes, M. K., Donowitz, M. 2014. Human enteroids as an *ex-vivo* model of host-pathogen interactions in the gastrointestinal tract. *Experimental Biology and Medicine*. 239 (9). 1124 – 1134.
- Gambini, J., Inglés, M., Olaso, G., Lopez-Grueso, R., Bonet-Costa, V., Gimeno-Mallench, L., Mas-Bargues, C., Abdelaziz, K. M., Gomez-Cabrera, M. C., Vina, J., Borrás C. 2015. Properties of Resveratrol: *In Vitro* and *In Vivo* Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015 (6). 837042.
- Gelberg, H. B. 2014. Comparative anatomy, physiology, and mechanisms of disease production of the esophagus, stomach, and small intestine. *Toxicologic Pathology*. 42 (1). 54 – 66.
- Gonzales, G. B., van Camp, J., Vissenaekens, H., Raes, K., Smagghe, G., Grootaert, Ch. 2015. Review on the Use of Cell Cultures to Study Metabolism, Transport, and Accumulation of Flavonoids: From Mono-Cultures to Co-Culture Systems. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 14 (6). 741 – 754.
- Goyal, R. K., Chaudhury, A. 2006. Physiology of esophageal motility. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 42 (5). 610 – 619.
- Grajek, W., Olejnik, A. 2004. Epithelial Cell Cultures *in Vitro* As a Model To Study Functional Properties of Food. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 13 (54). 5 – 24.
- 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. *Infection and Immunity*. 72 (4). 2160 – 2169.
- Grosse, C., Scherer, J., Koch, D., Otto, M., Taudte, N., Grass, G. 2006. A new ferrous iron-uptake transporter, EfeU (YcdN), from *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. 62 (1). 120–131.

- Guerin, J., Burgain, J., Borges, F., Bhandari, B., Desobry, S., Scher, J., Gaiani, C. 2017. Use of imaging techniques to identify efficient controlled release systems of *Lactobacillus rhamnosus* GG during *in vitro* digestion. *Food & Function*. 8 (4). 1587 – 1598.
- Guerra, A., Etienne-Mesmin, L., Livrelli, L., Denis, S., Blanquet-Diot, S., Alric, M. 2012. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in Biotechnology*. 30 (11). 591 – 600.
- Guthrie, A. R., Chow, H. H. S., Martinez, J. A. 2017. Effects of resveratrol on drug- and carcinogen-metabolizing enzymes, implications for cancer prevention. *Pharmacology Research and Perspectives*. 5 (1). 1 – 16.
- Haghshenas, B., Haghshenas, M., Nami, Y., Yari Khosroushahi, A., Abdullah, N., Barzegari, A., Rosli, R., Hejazi, M. S. 2016. Probiotic Assessment of *Lactobacillus plantarum* 15HN and *Enterococcus mundtii* 50H Isolated from Traditional Dairies Microbiota. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 6 (1). 37 – 47.
- Hamasalim, H. J. 2016. Synbiotic as feed additives relating to animal health and performance. *Advances in Microbiology*. 6 (4). 288 – 302.
- Hansson, G. C., Johansson, M. E. V. 2010. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Gut Microbes*. 1(1). 51 – 54.
- Haque, S. Z., Haque, M. 2017. The ecological community of commensal, symbiotic, and pathogenic gastrointestinal microorganisms – an appraisal. *Clinical and Experimental Gastroenterology*. 10. 91 – 103.
- Hattori, M., Taylor, T. D. 2009. The human intestinal microbiome: a new frontier of human biology. *DNA research*. 16 (1). 1 – 12.
- Hayashi, H., Takahashi, R., Nishi, T., Sakamoto, M., Benno, Y. 2005. Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and rectosigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism. *Journal of Medical Microbiology*. 54 (11). 1093 – 1101.
- Hill, D. R., Spence, J. R. 2017. Gastrointestinal Organoids: Understanding the Molecular Basis of the Host–Microbe Interface. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*. 3 (2). 138 – 149.
- Ho, J. T. K., Chan, G. C. F., Li, J. C. B. 2015. Systemic effects of gut microbiota and its relationship with disease and modulation. *BMC Immunology*. 16 (1). 1 – 6.
- Hu, B., Liu, X., Zhang, Ch., Zeng, X. 2017. Food macromolecule based nanodelivery systems for enhancing the bioavailability of polyphenols. *Journal of Food and Drug Analysis*. 25 (1). 3 – 15.

- Huang, W. Y., Cai, Y. Z., Zhang, Y. 2010. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: Potential use for cancer prevention. *Nutrition and Cancer*. 62 (1). 1 – 20.
- Chedea, V. S., Vicaș, S. I., Sticozzi, C., Pessina, F., Frosini, M., Maioli, E., Valacchi, G. 2017. Resveratrol: from diet to topical usage. *Food & Function*. 8 (11). 3879 – 3892.
- Cheng, L. K., O’Grady, G., Du, P., Egbuji, J. U., Windsor, J. A. Pullan, A. J. 2010. *Gastrointestinal systém. Wiley Interdisciplinary Reviews*. 2 (1). 65 – 79.
- Christenson, J., Whitby, S. J., Mellor, D., Thomas, J., McKune, A., Roach, P. D., Naumovski, N. 2016. The Effects of Resveratrol Supplementation in Overweight and Obese Humans: A Systematic Review of Randomized Trials. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*. 14 (7). 323 – 333.
- Inglis, G., Thomas, M. C., Thomas, D. K., Kalmokoff, M. L., Brooks, S. P., Selinger, L. B. 2012. Molecular Methods to Measure Intestinal Bacteria: A Review. *Journal of AOAC International*. 95 (1). 5 – 24.
- Jensen, H., Grimmer, S., Naterstad, K., Axelsson, L. 2012. *In vitro* testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. *International journal of food microbiology*. 153 (1). 216 – 222.
- Jin, S., Lim, B. O., Decker, E. A., McClements, D. J. 2011. *In vitro* human digestion models for food applications. *Food Chemistry*. Elsevier Ltd, 125 (1). 1 – 12.
- Joseph, I. M., Zavros, Y., Merchant, J. L., Kirschner, D. 2003. A model for integrative study of human gastric acid secretion. *Journal of Applied Physiology*. 94 (4). 1602 – 1618.
- Kafshdooz, T., Akbarzahed, A., Majdi Seghinsara, A., Pourhassan, M., Nasrabadi, H. T., Milani, M. 2017. Role of Probiotics in Managing of *Helicobacter Pylori* Infection: A Review. *Drug Research*. 67 (2). 88 – 93.
- Khoddami, A., Wilkes, M. A., Roberts, T. H. 2013. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*. 18 (2). 2328 – 2375.
- Kim, S., Covington, A., Pamer, E. G. 2017. The intestinal microbiota: Antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens. *Immunological Reviews*. 279 (1). 90 – 105.
- Koecher, K. J., Noack, J. A., Timm, D. A., Klosterbuer, A. S., Thomas, W., Slavin, J. L. 2014. Estimation and interpretation of fermentation in the Gut: Coupling results from a 24 h batch *in vitro* system with fecal measurements from a human intervention feeding study using fructo-oligosaccharides, inulin, gum acacia, and pea fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62 (6). 1332 – 1337.

- Kushwaha, R., Karanjekar, S. 2011. Standardization of ashwagandharishta formulation by TLC method. *International Journal of ChemTech Research*. 3(3). 1033 – 1036.
- LeBlanc, J. G., Chain, F., Martín, R., Bermúdez-Humarán, L. G., Courau, S., Langella, P. 2017. Beneficial effects on host energy metabolism of short-chain fatty acids and vitamins produced by commensal and probiotic bacteria. *Microbial Cell Factories*. 16 (1). 79.
- LeBlanc, J. G., Milani, Ch., de Giori, G. S., Sesma, F., van Sinderen, D., Ventura, M. 2013. Bacteria as vitamin suppliers to their host: A gut microbiota perspective. *Current Opinion in Biotechnology*. 24 (2). 160 – 168.
- Lee, Y. K., Salaminien, S. 2009. *Handbook of probiotics and prebiotics*, 2nd edition. A John Wiley & Sons. p. 596. ISBN: 978-0-470-13544-0.
- Lefebvre, D. E., Venema, K., Gombau, L., Valerio, L. G. Jr., Raju, J., Bondy, G. S., Bouwmeester, H., Singh, R. P., Clippinger, A. J., Collnot, E. M., Mehta, R., Stone, V. 2015. Utility of models of the gastrointestinal tract for assessment of the digestion and absorption of engineered nanomaterials released from food matrices. *Nanotoxicology*. 9 (4). 523 – 542.
- Lechanteur, A., das Neves, J., Sarmiento, B. 2017. The role of mucus in cell-based models used to screen mucosal drug delivery’, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 124. 50 – 63.
- Lewandowska, U., Szewczyk, K., Hrabec, E., Janecka, A., Gorlach, S. 2013. Overview of metabolism and bioavailability enhancement of polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61 (50). 12183 – 12199.
- Ley, R. E., Peterson, D. A., Gordon, J. I. 2006. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*. 124 (4). 837 – 848.
- Li, H., Jasper, H. 2016. Gastrointestinal stem cells in health and disease: from flies to humans. *Disease Models & Mechanisms*. 9 (5). 487 – 499.
- Liao, D. H., Zhao, J. B., Gregersen, H. 2009. Gastrointestinal tract modelling in health and disease. *World Journal of Gastroenterology*. 15 (2). 169 – 176.
- Linseisen, J., Rohrmann, S. 2008. Biomarkers of dietary intake of flavonoids and phenolic acids for studying diet-cancer relationship in humans. *European Journal of Nutrition*, 47 (2). 60 – 68.
- Lo Curto, A., Pitino, I., Mandalari, G., Dainty, J. R., Faulks, R. M., John Wickham, M. S. 2011. *Food Microbiology*. 28 (7). 1359 – 1366.

- Louis, P., Hold, G. L., Flint, H. J. 2014. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nature Reviews Microbiology*. 12 (10). 661 – 672.
- MacFarlane, G. T., MacFarlane, L. E. 2010. Acquisition, evolution and maintenance of the normal gut microbiota. *Digestive Diseases*. 27 (1). 90 – 98.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, Ch., Rémésy, Ch., Jiménez, L. 2004. Polyphenols: food source and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*. 79 (5). 727 – 747.
- Markowiak, P., Ślizewska, K. 2017. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients*. 9 (9). 1021.
- Marteau, P., Minekus, M., Havenaar, R., Huis in't Veld, J. H. 1997. Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. *Journal of Dairy Science*. 80 (6). 1031 – 1037.
- Martel, F., Monteiro, R., Calhau, C. 2010. Effect of polyphenols on the intestinal and placental transport of some bioactive compounds. *Nutrition Research Reviews*. 23 (1). 47 – 64.
- Marzorati, M., Verhelst, A., Luta, G., Sinnott, R., Verstraete, W., Van de Wiele, T., Possemiers, S. 2010. *In vitro* modulation of the human gastrointestinal microbial community by plant-derived polysaccharide-rich dietary supplements. *International Journal of Food Microbiology*. 139 (3). 168 – 176.
- McCracken, V. J., Lorenz, R. G. 2001. The gastrointestinal ecosystem: A precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. *Cellular Microbiology*. 3 (1). 1 – 11.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D. J., Ménard, O., Recio, I., Santos, C. N., Singh, R. P., Vegarud, G. E., Wickham, M. S., Weitschies, W., Brodkorb, A. 2014. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. *Food & Function*. 5 (6). 1113 – 1124.
- Mosele, J. I., Macià, A., Motilva, M. J. 2015. Metabolic and microbial modulation of the large intestine ecosystem by non-absorbed diet phenolic compounds: A review. *Molecules*. 20 (9). 17429 – 17468.
- Moser, S. A., Savage, D. C. 2001. Bile salt hydrolase activity and resistance to toxicity of conjugated bile salts are unrelated properties in lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology*. 67 (8). 3476 – 3480.

- N’Goma, J. C. B., Amara, S., Dridi, K., Jannin, V., Carrière, F. 2012. Understanding the lipid-digestion processes in the GI tract before designing lipid-based drug-delivery systems. *Therapeutic Delivery*. 3 (1). 105 – 124.
- Nguyen, C., Savouret, J. F., Widerak, M., Corvol, M. T., Rannou, F. 2017. Resveratrol, Potential Therapeutic Interest in Joint Disorders: A Critical Narrative Review. *Nutrients*. 9 (1). 45.
- Nord, C. E., Lidbeck, A. 1993. Lactobacilli and the normal human anaerobic mikroflóra. *Clinical Infectious Diseases*. 16 (4). 181 – 187.
- Nosova, T., Jousimies-Somer, H., Jokelainen, K., Heine, R., Salaspuro, M. 2000. Acetaldehyde production and metabolism by human indigenous and probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Alcohol and alcoholism*. 35 (6). 561 – 568.
- Nova, E., Wörnberg, J., Gómez-Martínez, S., Díaz, L. E., Romeo, J., Marcos, A. 2007. Immunomodulatory effects of probiotics in different stages of life. *British Journal of Nutrition*. 98 (1). 90 – 95.
- Nyangale, E. P., Mottram, D. S., Gibson, G. R. 2012. Gut microbial activity, implications for health and disease: the potential role of metabolite analysis. *British Journal of Nutrition*. 11. 5573 – 5585.
- Ogah, O., Watkins, C. S., Ubi, B. E., Oraguzie N. C. 2014. Phenolic compounds in rosaceae fruit and nut crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62 (39). 9369 – 9386.
- Palencia, F., López, P.; Corbí, A. L., Peláez, C., Requena, T. 2008. Probiotic strains: survival under simulated gastrointestinal conditions, *in vitro* adhesion to Caco-2 cells and effect on cytokine secretion. *European Food Research and Technology*. 227. 1475 – 1484.
- Pandey, K. R., Naik, S. R., Vakil, B. V. 2015. Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. *Journal of Food Science and Technology*. 52 (12). 7577 – 7587.
- Parkar, S. G., Stevenson, D. E., Skinner, M. A. 2008. The potential influence of fruit polyphenols on colonic microflora and human gut health. *International Journal of Food Microbiology*. 124. 295 – 298.
- Patel, R., Dupont, H. L. 2015. New approaches for bacteriotherapy: Prebiotics, new-generation probiotics, and synbiotics. *Clinical Infectious Diseases*. 60 (2). 108 – 121.
- Payne, A. N., Zihler, A., Chassard, C., Lacroix, C. 2012. Advances and perspectives in *in vitro* human gut fermentation modeling. *Trends in Biotechnology*. 30 (1). 17 – 25.
- Pedersen, I. G. 2015. Development, validation and implementation of an *in vitro* model for the study of metabolic and immune function in normal and inflamed human colonic epithelium. *Danish Medical Journal*. 62 (1). 298 – 306.

- Peng, R. M., Lin, G. R., Ting, Y., Hu, J. Y. 2018. Oral delivery system enhanced the bioavailability of stilbenes: resveratrol and pterostilbene. *BioFactors*. 44 (1). 5 – 15.
- Peña, A. S. 2007. Intestinal flora, probiotics, prebiotics, synbiotics and novel foods. *Revista Espanola De Enfermedades Digestivas*. 99 (11). 653 – 658.
- Peres, C. M., Hernandez-Mendoza, A., Bronze, M. R., Peres, C., Xavier Malcata, F. 2015. Synergy of olive bioactive phytochemicals and probiotic strain in control of *Escherichia coli*. *Food Science and Technology*. 64 (2). 938 – 945.
- Pessione, E. 2012. Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2 (86). 86.
- Petra, C. V., Rus, A., Dumitrașcu, D. L. 2017. Gastric Microbiota: Tracing the Culprit. *Clujul Medical*. 90 (4). 369 – 376.
- Phillips, S. F., Pemberton, J. H., Shorter, R. G., Talbot, I. C. 1993. The Large Intestine: Physiology, Pathophysiology and Disease. 23 (4). p. 391.
- Piotrowska, H., Kucinska, M., Murias, M. 2012. Biological activity of piceatannol: Leaving the shadow of resveratrol. *Mutation Research*. 750 (1). 60 – 82.
- Pitino, I., Randazzo, C. L., Mandalari, G., Lo Curto, A., Faulks, R. M., Le Marc, Y., Bisignano, C., Caggia, C., Wickham, M. S. 2010. Survival of *Lactobacillus rhamnosus* strains in the upper gastrointestinal tract. *Food Microbiology*. 27 (8). 1121 – 1127.
- Pompei, A., Cordisco, L., Amaretti, A., Zanoni, S., Matteouzzi, D., Rossi, M. 2007. Folate production by bifidobacteria as a potential probiotic property. *Applied and Environmental Microbiology*. 73 (1). 179 – 185.
- Rakowska, M., Lichosik, M., Kacik, J., Kalicki, B. 2016. The impact of the microbiota on human health. *Pediatrics i Medycyna Rodzinna*. 12 (4). 404 – 412.
- Rivière, C., Pawlus, A. D., Mérillon, J. M. 2012. Natural stilbenoids: distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in *Vitaceae*. *Natural Product Reports*. 29 (11). 1317.
- Roca-Saavedra, P., Mendez-Vilabril, V., Miranda, J. M., Neboř, C., Cardelle-Cobas, A., Franco, C. M., Cepeda, A. 2017. Food additives, contaminants and other minor components: effects on human gut microbiota-a review. *Journal of Physiology and Biochemistry*. 74 (1). 69 – 83.
- Rosillo, M. A., Alarcón-de-la-Lastra, C., Sánchez-Hidalgo, M. 2016. An update on dietary phenolic compounds in the prevention and management of rheumatoid arthritis. *Food & Function*. 7 (7). 2943 – 2969.

- Rossi, E., Cimdins, A., Lüthje, P., Brauner, A., Sjöling, Å., Landini, P., Römling, U. 2017. “It’s a gut feeling” – *Escherichia coli* biofilm formation in the gastrointestinal tract environment. *Critical Reviews in Microbiology*. 44 (1). 1 – 30.
- Roupe, K. A., Remsberg, C. M., Yáñez, J. A., Davies, N. M. 2006. Pharmacometrics of Stilbenes: Seguing Towards the Clinic. *Current Clinical Pharmacology*. 1 (1). 81–101.
- Sahadeva, R. P. K., Leong, S. F., Chua, K. H., Tan, C. H., Chan, H. Y., Tong, E. V., Wong, S. Y. W., Chan, H. K. 2011. Survival of commercial probiotic strains to pH and bile. 18 (4). 1515 – 1522.
- Sams, L., Paume, J., Giallo, J., Carrière, F. 2016. Relevant pH and lipase for *in vitro* models of gastric digestion. *Food & Function*. 7 (1). 30–45.
- San Roman, A. K., Shivdasani, R. A. 2011. Boundaries, junctions and transitions in the gastrointestinal tract. *Experimental Cell Research*. 317 (19). 2711 – 2718.
- Sánchez, B., Schmitter, J. M., Urdaci, M. C. 2009. Identification of novel proteins secreted by *Lactobacillus plantarum* that bind to mucin and fibronectin. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 17. 158 – 162.
- Sanders, K. M., Koh, D., Ward, S. M. 2006. Interstitial Cells of Cajal As Pacemakers in the Gastrointestinal Tract. *Annual Review of Physiology*. 68. 307 – 343.
- Sarao, L. K., Arora, M. 2017. Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 57 (2). 344 – 371.
- Savage, D. C. 1977. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annual Reviews in Microbiology*. 31. 107–133.
- Sears, C. L. 2009. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: A rogue among symbiotes. *Clinical Microbiology Reviews*. 22 (2). 349 – 369.
- Selle, K., Klaenhammer, T. R. 2013. Genomic and phenotypic evidence for probiotic influences of *Lactobacillus gasseri* on human health. *FEMS Microbiology Reviews*. 37 (6). 915 – 935.
- Shani-Levi, C., Alvito, P., Andrés, A., Assunção, R., Barberá, R., Blanquet-Diot, S., Bourlieu, C., Brodkorb, A., Cilla, A., Deglaire, A., Denis, S., Dupont, D., Heredia, A., Karakaya, S., Giosafatto, C. V. L., Mariniello, L., Martins, C., Ménard, O., Nehir El, S., Vegarud, G. E., Ulleberg, E., Lesmes, U. 2017. Trends in Food Science & Technology Extending *in vitro* digestion models to specific human populations: Perspectives, practical tools and bio-relevant information. *Trends in food science & technology*. 60. 52 – 63.

- Shen, S., Callaghan, D., Juzwik, C., Xiong, H., Huang, P., Zhang, W. 2010. ABCG2 reduces ROS-mediated toxicity and inflammation: A potential role in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*. 114 (6). 1590 – 1604.
- Schubert, M. L. 2008. Hormonal regulation of gastric acid secretion. *Current Gastroenterology Reports*. 10 (6). 523 – 527.
- Singh, M., Arseneault, M., Sanderson, T., Murthy, V., Ramassamy, C. 2008. Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer's disease: Bioavailability, metabolism, and cellular and molecular mechanisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56 (13). 4855 – 4873.
- Sirisinha, S. 2016. The potential impact of gut microbiota on your health: Current status and future challenges. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*. 34 (4). 249 – 264.
- Smoliga, J. M., Blanchard, O. 2014. Enhancing the delivery of resveratrol in humans: If low bioavailability is the problem, what is the solution?. *Molecules*. 19 (11). 17154 – 17172.
- Soto-vaca, A., Gutierrez, A., Losso, J. N., Xu, Z., Finley, J. W. 2012. Evolution of good polyphenolics from color and flavor problems to health benefits Evolution of Phenolic compounds from Color and Flavor Problems to Health Benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60 (27). 6658 – 6677.
- Thompson, C. A., DeLaForest, A., Battle, M. A. 2018. Patterning the gastrointestinal epithelium to confer regional-specific functions. *Developmental Biology*. 435 (2). 97 – 108.
- Toivanen, M., Huttunen, S., Lapinjoki, S., Tikkanen-Kaukanen, C. 2011. Inhibition of adhesion of *Neisseria meningitidis* to human epithelial cells by berry juice polyphenolic fractions. *Phytotherapy Research*. 25 (6). 828 – 832.
- Tomás-Barberán, F. A., Selma, M. V., Espín, J. C. 2016. Interactions of gut microbiota with dietary polyphenols and consequences to human health. 19 (6). 471 – 476.
- Trela, B. C., Waterhouse, A. L. 1996. Resveratrol: Isomeric molar absorptivities and stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44 (5). 1253 – 1257.
- Turco, L., Catone, T., Caloni, F., Di Consiglio E., Testai, E., Stamatii, A. 2011. Caco-2/TC7 cell line characterization for intestinal absorption: How reliable is this *in vitro* model for the prediction of the oral dose fraction absorbed in human?. *Toxicology in Vitro*. 25 (1). 13–20.
- Van Loo, J., Clune, Y., Bennett, M., Collins, J. K. 2005. The SYNCAN project: goals, set-up,

- first results and settings of the human intervention study. *British Journal of Nutrition*. 93 (1). 91 – 98.
- van Wyk, H. 2015. Probiotics : review. *SA Pharmaceutical Journal*. 82. 17 – 21.
- Vogt, S. L., Peña-Díaz, J., Finlay, B. B. 2015. Chemical communication in the gut: Effects of microbiota-generated metabolites on gastrointestinal bacterial pathogens. *Anaerobe*. 34. 106 –115.
- Volstatova, T., Marsik, P., Rada, V., Geigerova, M., Havlik, J. 2017. Effect of apple extracts and selective polyphenols on the adhesion of potential probiotic strains of *Lactobacillus gasseri* R and *Lactobacillus casei* FMP. *Journal of Functional Foods*. 35. 391 – 397.
- von Martels, J. Z. H., Sadaghian Sadabad, M., Bourgonje, A. R., Blokzijl, T., Dijkstra, G., Wang, B., Wei, H., Yuan, J., Li, Q., Li, Y., Li, N., Li, J. 2008. Identification of a surface protein from *Lactobacillus reuteri* JCM1081 that adheres to porcine gastric mucin and human enterocyte-like HT-29 cells. *Current Microbiology*. 57 (1). 33 – 38.
- Wang, L. L., Yu, X. J., Zhan, S. H., Jia, S. J., Tian, Z. B., Dong, Q. J. 2014. Participation of microbiota in the development of gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology*. 20 (17). 4948 – 4952.
- West, N. P., Pyne, D. B., Peake, J. M., Cripps, A. W. 2009. Probiotics, immunity and exercise: A review. *Exercise Immunology Review*. 15. 107 – 126.
- WHO. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food Report. 2002. London, Ontario, Canada. p. 11. ISBN: 4081401500
- Williamson, G., Clifford, M. N. 2017. Role of the small intestine, colon and microbiota in determining the metabolic fate of polyphenols. *Biochemical Pharmacology*. 139. 24 – 39.
- Yadav, A. K., Tyagi, A., Kumar, A., Panwar, S., Grover, S., Saklani, A. C., Hemalatha, R., Batish, V. K. 2017. Adhesion of *Lactobacilli* and their anti-infectivity potential, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 57 (10). 2042-2056.
- Yildirim, A. B., Guner, B., Karakas, F. P., Turker, A. U. 2017. Evaluation of Antibacterial, Antitumor, Antioxidant Activities and Phenolic Constituents of Field-Grown and *in vitro*-Grown *Lysimachia Vulgaris* L. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines*. 14 (2). 177 – 187.
- Yurist-Doutsch, S., Arrieta, M. C., Vogt, S. L., Finlay, B. B. 2014. Gastrointestinal Microbiota–Mediated Control of Enteric Pathogens. *Annual Review of Genetics*. 48. 361 –382.

- Zeng, M. Y., Inohara, N., Nuñez, G. 2017. Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut. *Mucosal Immunology*. 10 (1). 18 – 26.
- Zhang, M. M., Cheng, J. Q., Lu, Y. R., Yi, Z. H., Yang, P., Wu, X. T. 2010. Use of pre-, pro- and synbiotics in patients with acute pancreatitis: A meta-analysis. *World Journal of Gastroenterology*. 16(31). 3970 – 3978.
- Zilberstein, B., Quintanilha, A. G., Santos, M. A., Pajecki, D., Moura, E. G., Alves, P. R., Maluf Filho, F., de Souza, J. A., Gama-Rodrigues, J. 2007. Digestive tract microbiota in healthy volunteers. *Clinics*. 62 (1). 47 – 54.