

**Česká zemědělská univerzita v Praze**  
**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**  
**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Česká zemědělská  
univerzita v Praze**

**Účinky lepků na střevní mikrobiom**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Petr Šmíd**

**Obor studia Výživa a potraviny**

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

© 2021 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Účinky lepku na střevní mikrobiom" jsem vypracoval 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 autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 26.4.2021

\_\_\_\_\_

## **Poděkování**

Rád bych touto cestou poděkoval svému vedoucímu diplomové práce Ing. Ivo Doskočilovi, Ph.D. za profesionální vedení v laboratoři, ochotu, trpělivost, cenné rady a vstřícný přístup při mé práci.

# Účinky lepku na střevní mikrobiom

## Souhrn

Gastrointestinální trakt člověka je osídlen velkým množstvím mikroorganismů. Tyto mikroorganismy společně utváří střevní mikrobiotu. Střevní mikrobiota ovlivňuje svého hostitele v mnoha aspektech. Mezi nejpočetnější mikroorganismy patří bakterie rodu *Lactobacillus spp.* a *Bifidobacterium spp.* Kromě významné role při vývoji imunity a zdravého gastrointestinálního traktu, se podílí na trávení jinak nestravitelných složek potravy, které jsou pro mikroorganismy zároveň zdrojem energie a substrátu. Procesem fermentace štěpí tyto složky na další látky, pomocí kterých dokážou regulovat prostředí střev, ovlivnit samotnou skladbu mikrobioty a zamezit rozvoji onemocnění a patogenních kolonií. Člověk svým životním stylem ovlivňuje zdravotní stav své mikrobioty, přičemž způsob stravování hraje nejvýznamnější roli. V dietě většiny lidí převládá bílé pečivo, které je bohaté na lepek. Schopnost probiotických mikroorganismů rodu *Lactobacillus spp.* adherovat na buňky střevního epitelu za přítomnosti tráveniny obsahující lepek, byla cílem praktické části této práce.

Tato práce navazuje na poznatky z bakalářské práce, kdy byla testována schopnost probiotik adherovat na buňky střevního epitelu za přítomnosti neupraveného čistého lepku. Testované vzorky běžného pečiva rohlík, bageta, chléb Šumava a lepek čistý a lepek podrobený tepelné úpravě, byly tráveny standardizovaným *in vitro* modelem trávení s orální, gastrickou a intestinální fází trávení. Vlastní trávení na konci intestinální fáze bylo zastaveno zamražením na - 80 °C. Pro stanovení vlivu vzorků na adhezi vybraných laktobacilů na buněčnou linii Caco-2, která byla pěstována do plné diferenciaci buněk v DMEM médiu po dobu 7 dní, v 5 % CO<sub>2</sub> atmosféře při 37 °C. Poté byla založena 96 jamková destička, kam byly aplikovány probiotické kmeny *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus gaserii*, *Lactobacillus fermentum* a poté trávenina. Byla zavedena nová metodika pro zjištění obsahu adherovaných laktobacilů, využívající barvení laktobacilů fluoresceinem. Po inkubaci byly mikrotitrační destičky promyty a měřeny při 478/510 nm pomocí fluorescenčního readeru.

Bylo zjištěno, že testované množství vzorku 80 µg bylo schopné zcela zabránit probiotickým mikroorganismům adherovat na buněčné linie. Nejvýrazněji byl zasažen kmen *Lactobacillus fermentum*. Trávenina měla negativní vliv na vlastní buněčný model, kdy došlo k jejímu částečnému nebo úplnému poškození. Tato poškození zamezila zjištění přesnějších výsledků schopnosti probiotických bakterií adherovat na buněčný model. Testované probiotické kmeny však v prostředí bez lepku dokázali adherovat z 20 %.

Výsledky naznačují, že lepek dokáže negativně ovlivnit adhezní schopnosti probiotických mikroorganismů. Lepek tedy negativně působí na schopnost mikroorganismů adherovat a zároveň má vliv na samotný střevní epitel. Je pravděpodobné, že u nižších koncentrací tráveniny by nemuselo dojít k poškození buněčného modelu.

**Klíčová slova:** Lepek; adherence; střevní model; *in vitro*; probiotika

# Effects of gluten on the gut microbiota

## Summary

Human gastrointestinal tract is populated by a large amount of microorganisms. Together, those microorganisms create gut microbiota. Gut microbiota affects its host by many aspects. Most numerous microorganisms are bacterial strains *Lactobacillus spp.* and *Bifidobacterium spp.* Besides important role at immunity development and healthy gastrointestinal tract, they participate in digestion of normally undigestible food components, which are a source of energy and substrate for microorganisms. Fermentation process splits those food components into other substances that can help microbiota to modulate gut environment, composition of microbiota and to avoid disease spread and pathogen colonization. Human can affect its microbiota health condition by lifestyle, whereas the diet plays the most important role. In the diet of the most people dominate white pastry, which is rich in gluten. Adhesion ability of probiotic microorganism strain *Lactobacillus spp.* to adhere to the cells of intestinal epithelial cells in the presence of digestion containing gluten was the aim of the practical part of this thesis.

This thesis follows up the bachelor thesis, when the adhesion ability of probiotic strains to adhere to the cells of intestinal epithelial cells in the presence of non-modified gluten was tested. Tested samples of common pastry roll, baguete, Šumava bread and clean gluten and baked gluten, were digested by standardized *in vitro* digestion model consisting of oral, gastric and intestinal phase of digestion. Digestion was stopped at the end of intestinal phase by deeply freezing the samples by -80 °C. For determination effect of samples on adhesion ability of chosen lactobacillus strains on Caco-2 cell lines, which was cultivated to full cell differentiation in DMEM medium for the period of 7 days, in 5 % CO<sub>2</sub> atmosphere at 37 °C. After that, 96 well plate was created where probiotic strains *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus gasearii*, *Lactobacillus fermentum* and digestion were applied. New methodology was set to find out the content of adhered lactobacillus strains with use of staining lactobacilli with fluorescein. After the incubation period microtiter wells were washed and measured at 478/510 nm per fluorescent reader.

It was found, that tested amount of digested samples 80 µg was able to completely stop probiotic microorganisms adhesion on cell lines. *Lactobacillus fermentum* strain adhesion ability was hit hardest. The digestion had negative impact on its own cell model, when cell model was partially or completely damaged. That damage prevented more accurate results of how probiotic strains were able to adhere to the cell model. However tested probiotic strains were able to adhere to cell model by 20 % in the medium without the presence of digestion.

The results suggest that gluten can negatively affect adhesion ability of probiotic strains. Gluten therefore has a negative effect on probiotic strains adhesion ability and at the same time has effect on cell model itself. It is probable, that lower amount of digestion wouldn't be able to damage cell model.

**Keywords:** Gluten; adhesion; gut model; *in vitro*; probiotics

# Obsah

<b>1 Úvod</b> .....	<b>8</b>
<b>2 Vědecká hypotéza a cíle práce</b> .....	<b>9</b>
<b>2.1 Vědecká hypotéza</b> .....	<b>9</b>
<b>2.2 Cíl práce</b> .....	<b>9</b>
<b>3 Literární rešerše</b> .....	<b>10</b>
<b>3.1 Gastrointestinální trakt člověka</b> .....	<b>10</b>
<b>3.2 Střevní mikrobiota člověka</b> .....	<b>12</b>
3.2.1 Střevní mikrobiota .....	12
3.2.2 Složení střevní mikrobioty .....	13
3.2.3 Vliv stravy na střevní mikrobiom člověka .....	14
3.2.4 Funkce střevní mikrobioty .....	15
<b>3.3 Probiotika</b> .....	<b>18</b>
3.3.1 Význam probiotik .....	18
3.3.2 Vlastnosti probiotik .....	19
3.3.3 Probiotické organismy .....	22
3.3.4 <i>Lactobacillus</i> spp. ....	23
3.3.5 Adheze .....	23
<b>3.4 Lepek</b> .....	<b>25</b>
3.4.1 Vlastnosti lepku .....	27
3.4.2 Účinky lepku .....	28
3.4.3 Tolerance lepku .....	29
3.4.4 Celiakie .....	29
3.4.5 Bezlepková dieta .....	30
<b>3.5 In vitro trávení</b> .....	<b>31</b>
<b>4 Materiál a metodika</b> .....	<b>34</b>
<b>4.1 Materiál</b> .....	<b>34</b>
<b>4.2 Metodika</b> .....	<b>34</b>
4.2.1 Příprava vzorků .....	34
4.2.2 <i>In vitro</i> střevní model .....	34
4.2.3 Kultivace buněčných linií .....	36
4.2.4 Založení 96 jamkové destičky .....	36
4.2.5 Příprava laktobacilů .....	37
4.2.6 Adherence .....	37
4.2.7 Statistické vyhodnocení .....	37

<b>5</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>38</b>
<b>6</b>	<b>Diskuse .....</b>	<b>42</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>45</b>
<b>8</b>	<b>Seznam použitých zdrojů.....</b>	<b>46</b>

# 1 Úvod

Gastrointestinální trakt člověka je kolonizován obrovským počtem mikroorganismů tvořících střevní mikrobiom a nacházejících se zejména v tlustém střevě. Mikrobiom obsahuje až 150× větší počet genů, než jsme schopni nalézt v lidském genomu. Střevní mikrobiom je ovlivňován životním stylem svého hostitele, a to zejména přijímanou potravou. Během života se mikrobiom neustále mění a má významný vliv na svého hostitele. Svému hostiteli pomáhá trávením jinak nestravitelných zbytků, přispívá k udržování homeostázy, působí na imunitu hostitele a chrání před patogenními organismy. Zdravá mikrobiota napomáhá při léčbě některých druhů onemocnění, může však dojít ke stavu dysbiózy, kdy svému hostiteli dokáže naopak škodit.

Nejčastěji přijímanou složkou potravy je pšeničná mouka, jedná se o jednu z nejkonzumovanějších potravin světa. Její vliv na zdraví člověka, přesněji na residentní mikrobiotu, se stal předmětem výzkumu posledních let vzhledem k rozvíjejícím se onemocněním a poruchám spojených s konzumací obilovin. Onemocnění jako celiakie či intolerance lepku naznačují, že značnou roli při těchto poruchách hraje střevní mikrobiota.

Lepek obsažený v pšenici může mít daleko rozsáhlejší vliv na správnou funkci imunitního systému člověka. Prostřednictvím různých interakcí se střevním epitelem dokáže lepek zabránit adhezenci probiotických mikroorganismů a tím zamezit jejich příznivému účinku. Doposud se tématem přímého vlivu lepku na střevní mikrobiom nikdo významně nezabýval, ale je jasné, že s rozvojem technologií a metod pro zkoumání interakcí střevní mikrobioty s různými složkami potravy, dojde v tomto oboru ke změně.



## **2 Vědecká hypotéza a cíle práce**

### **2.1 Vědecká hypotéza**

Lepek obsažený v potravinách hraje roli při adhezenci probiotických střevních kmenů člověka. Čistý lepek může ovlivňovat adhezenci jinak než lepek obsažený v pečivu, který prošel tepelnou úpravou.

### **2.2 Cíl práce**

Cílem práce je otestování vybraných probiotických kmenů běžně se vyskytujících v lidském střevním mikrobiomu na jejich schopnost adherovat za přítomnosti čistého a pečeného lepku, který prošel trávením až po příslušnou střevní fázi. Práce přímo navazuje na výsledky bakalářské práce na téma účinky lepku na střevní mikrobiom a rozšiřuje ji o nové poznatky v teoretické i praktické části.

## 3 Literární rešerše

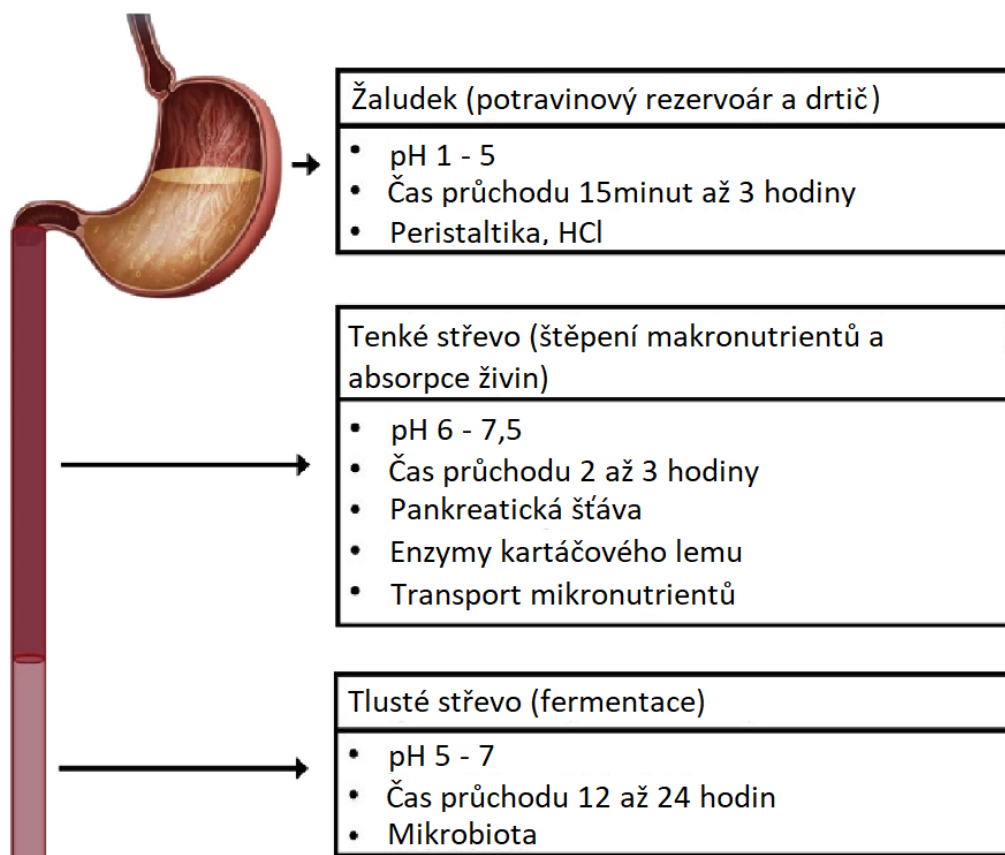
### 3.1 Gastrointestinální trakt člověka

Proces trávení v lidském gastrointestinálním traktu je dynamický a nepřetržitý. Celý proces trávení začíná v dutině ústní žvýkáním a prosliněním tráveniny (Li et al. 2020a). Mastikace je komplexní orální motorické chování modulující pohyby čelistí. Dochází k mechanickému zpracování potravy na fragmenty pomocí drcení, řezání, broušení, lisování a stříhání v procesu žvýkání (Li et al. 2020a). Sliny jsou komplexní viskózní vodné médium, které obsahuje 99,5 % vody a 0,3 % bílkovin, enzymů a elektrolytů jako jsou sodík, draslík, vápník, hořčík, fosfát a hydrogenuhličitan. V lidských slinách bylo identifikováno na 30 různých enzymů (Salles et al. 2010). Ve slinách se dále nachází imunoglobulin A, lysozym, laktoferin a slizniční glykoproteiny (muciny) (Minekus et al. 2014b).

Výsledný bolus je přenesen pomocí peristaltických pohybů jícnu do žaludku. Žaludek je rozdělen na čtyři hlavní části (fundus, tělo, antrum a pylorus) a celkový klidový objem (nalačno) je zhruba 1 litr, dokáže se však rozšířit na 1,5 – 4 litry (Norton et al. 2014). Proximální část žaludku včetně fundu a těla, působí jako rezervoár nestráveného materiálu, zatímco distální žaludek (antrum) drtí a mísí pevnou potravu. Zároveň funguje jako čerpadlo pro vyprazdňování žaludku a posílání rozmělněného materiálu směrem do duodena přes pylorus (Kong & Singh 2008). Rychlost rozpadu potravy v žaludku je ovlivňována pohyblivostí žaludku, změnou sil, tlaku a změnou toků žaludečního obsahu. Žaludeční pohyby bývají za syceného stavu charakteristické frekvencí 2,6 – 3 vlny za minutu a rychlostí šíření 2,5 mm/s, směrem od kardie k pyloru. Peristaltické vlny způsobují, že chymus je poháněn zpět do vlastního těla žaludku pomocí retropulze, při které dochází k důkladnému promíchání a emulgování tráveniny vylučovanými žaludečními šťávami. Kontrakční síly jsou v závislosti na stavu nalačno, či nasycení schopné vyvinout sílu o velikosti 0,2 až 1,89 Newtonů (Norton et al. 2014). Požitý bolus je rozmělněn pomocí nepravidelných antrálních, tonických a fyzických pylorických kontrakcí až na částice o velikosti <1–2 mm. Tyto malé částice tvoří spolu se žaludeční šťávou chymus a pulzujícím pohybem vstupují do duodena proti pylorické rezistenci (Stevens et al. 2013; Li et al. 2020a). Žaludek vylučuje průměrně 2-3 l žaludeční tekutiny (pH 2) skládající se ze soli, žaludeční kyseliny (kyseliny chlorovodíkové) a trávicích enzymů (pepsin, lipáza) (Bornhorst & Paul Singh 2014). Jelikož se jedná o agresivní žaludeční šťávy, je žaludeční stěna pokryta gelovitou slizniční vrstvou, která chrání před vlastním poškozením působením kyselin přítomných v trávicí šťávě. Tato vrstva je produkována foveolárními buňkami, které jsou lokalizovány v žaludečních jamkách, kde produkují hlen a hydrogenuhličitanové ionty. Mimo to žaludeční fundus a tělo obsahují žaludeční krypty naplněné hlenovými buňkami krčku, které také vylučují hlen k ochraně žaludečního epitelu. Za sekreci kyseliny chlorovodíkové a vnitřního faktoru jsou zodpovědné krycí buňky. Hlavní buňky jsou buňky produkující neaktivní prekursor pepsinogen. Hlavní buňky zároveň sekretují žaludeční lipázu, která je zodpovědná za 10-30 % hydrolýzy triglyceridů ve stravě (Bornhorst & Paul Singh 2014). K vyprázdňování žaludku dochází různě rychle a významnou roli hraje velikost a složitost částic tráveniny. Pevné potraviny bývají vyprazdňovány do tenkého střeva po 3-5 hodinách, kdy velikost částic je menší než 2 mm. Tekutá potrava s nízkým obsahem živin se obvykle vyprazdňuje bez zpoždovací fáze do 20 minut (Norton et al. 2014). V neposlední řadě je

rychlost vyprázdnění žaludku závislá na fyzické aktivitě a pohlaví jedince (Bornhorst & Paul Singh 2014).

Hlavní proces trávení probíhá v tenkém střevě skládajícím se z dvanáctníku (*duodenum*), lačníku (*jejunum*) a kyčelníku (*ileum*). Většina trávení probíhá v duodenu a ve zbylých částech pak převládá absorpce natrávených živin. Složitá topologie výstelky střev jim dává obrovskou absorpční plochu. Za trávení jsou zodpovědné pankreatické enzymy (směs proteáz, amyláz a lipáz) a další enzymy produkované vnitřní stěnou tenkého střeva. Kromě enzymů je do duodena vylučován hydrogenuhličitan za účelem udržení pH 6-7, což je optimální pH pro trávení tuků, sacharidů ale i bílkovin (Campbell et al. 2019). Emulgace tuků v duodenu je navíc podpořena lipázou. Voda a živiny jsou absorbovány enterálními buňkami klků pomocí jednoduché difúze, usnadněné difúze, nebo aktivním transportem. Chymus je transportován střevy segmentací a peristaltickými svalovými kontrakcemi, které jsou regulovány kombinací myogenních, nervových a hormonálních faktorů (Campbell et al. 2019). Motilita tenkého střeva je významně ovlivňována působením hormonů gastrinu, cholecystokininu, sekretinu a glukagonu. Segmentace je druh střevní motility, kdy dochází pomocí vln na krátké vzdálenosti k míchání za účelem zlepšit kontakt mezi chymem a povrchy vil (Bornhorst & Paul Singh 2014). Motorická aktivita pokračuje během pústové fáze pomocí migračního motorického komplexu (MMC), aby se nestrávený materiál v tenkém střevě vytlačil do střeva tlustého, kde podstoupí intenzivní působení rezidentní mikrobioty (Booijink et al. 2010; Li et al. 2020a).



**Obrázek 1:** Přehled specifičnosti trávení jednotlivých segmentů gastrointestinálního traktu. Upraveno podle (Li et al. 2020a).

## 3.2 Střevní mikrobiota člověka

Lidská střevní mikrobiota představuje komplexní ekosystém rozprostírající se napříč celým gastrointestinálním traktem. Skládá se z bakterií, které jsou výjimečně různorodé, ze zástupců archea a eukaryot obecně (Rajilic-Stojanovic et al. 2007). První objevenou a identifikovanou bakterií gastrointestinálního traktu byla *Escherichia coli* v roce 1885 u dítěte (Rajilic-Stojanovic et al. 2007). Mezi nejpočetnější bakterie patří zástupci devíti rodů, z nichž nejpočetněji zastoupení jsou *Firmicutes*, *Bacteroidetes* a *Acinetobakter* (Backhed et al. 2005). V rámci gastrointestinálního traktu byli objeveni i zástupci Proteobakterii, jejich význam je však druhořadý. Dle studie Rajilic-Stojanovic et al (2007), se odhaduje více než 1200 virových genotypů s obsahem až  $10^9$  virionů na gram hmoty izolované z gastrointestinálního traktu. Mnoho studií (Arumugam et al. 2011; Clemente et al. 2012; Riasat et al. 2016) se pokusilo popsat normální gastrointestinální mikrobiotu podle rozdělení do druhů, které osidlují zdravé lidi. Tento koncept je velmi složité poskládat, protože mezi jedinci existují velké rozdíly ve složení této mikrobioty a zároveň se nepracuje s dostatečně velkým vzorkem populace, aby byly pokryty všechny rozdíly. Z tohoto důvodu zůstává popis normálního složení stále nekompletní (Rajilic-Stojanovic et al. 2007; Wang et al. 2017a). Ačkoliv je celkový pohled stále nekompletní, řada autorů odhaduje diverzitu na 400–800 druhů (Backhed et al. 2005; Nicholson et al. 2005; Phillips 2006).

### 3.2.1 Střevní mikrobiota

Lidské střevní mikrobiotě se za posledních 15 let dostává stále větší pozornosti (Perry et al. 2016; Wang et al. 2017a). Změny ve složení mikrobioty sledují mnohé studie (Denou et al. 2015; Radilla-Vázquez et al. 2016; Gomes et al. 2017) zabývající se obezitou, cukrovkou, onemocněním jater, nádorovými onemocněními, a dokonce neurodegenerativními onemocněními (Cani 2018). V letech 2013 až 2017 vzniklo na 12 900 publikací zabývajících se střevní mikrobiotou. Díky zavedení genetických nástrojů a metagenomické revoluci za posledních 15 let jsme nyní schopni charakterizovat složení a funkci mikrobioty z různých částí těla a následně je spojovat s potenciálními nemocemi, riziky nebo konkrétními klinickými projevy (Cabinian et al. 2018). Nedávné studie (McFarland 2015; Gasbarrini et al. 2016) se zabývají různými aspekty mikrobioty a její potenciální rolí v lidském zdraví, včetně raného života (Milani et al. 2017; Ximenez & Torres 2017; Sprockett et al. 2018).

Střevní mikrobiota je nyní považována za důležitého partnera, interagujícího s celou řadou lidských buněk. Kromě bakterií se na střevním mikrobiomu podílejí také další klíčové mikroorganismy, jako například archeae, viry, řasy, kvasinky a houby. Tyto mikroorganismy, které pravděpodobně kontrolují aktivitu hostitele, a to převážně přímo střevní mikroby, byly podrobně prozkoumány a mohou být stejně důležité jako bakterie. Proto archeae, virom, fageom a mykobiom nabízejí další dimenzi pro zkoumání interakcí mezi hostitelem a jeho mikrobiomem. Například řasy svým počtem až  $10\times$  překračují počet bakterií a je prokázáno, že jsou zodpovědné za řadu interakcí s hostitelem a jeho mikrobiomem (Cani 2018; Forde & Hill 2018). Většina mikroorganismů se nachází v distálnějších částech trávicího traktu, kde jejich biomasa překračuje  $10^{11}$  buněk na gramový obsah (Walter & Ley 2011). Mikroby v distální části střev přispívají ke zdraví hostitele prostřednictvím biosyntézy vitamínů a esenciálních aminokyselin a štěpením nestravitelných složek potravy na vedlejší metabolické

produkty (Backhed et al. 2005). Butyrát, acetát a propionát fungují jako hlavní zdroj energie pro buňky střevního epitelu a posilují tak střevní slizniční bariéru (Topping & Clifton 2001).

Různé systémy rozpoznávají a monitorují přítomnost mikroorganismů v těle. Například v gastrointestinálním traktu tuto roli plní epitelové buňky, které předávají klíčové informace do imunitních buněk, umístěných v lamina propria. Monitorování a rozpoznávání mikrobů se provádí hlavně vrozeným imunitním systémem s receptory rozpoznávání vzorů (PRR), jako jsou toll-like receptory (TLR) a NOD-like receptory (NLR). TLR jsou transmembránové receptory exprimované na buněčných membránách (TLR-2/4/5) nebo v endolysozomálních kompartmentech (TLR-3/7), zatímco NOD jsou cytosolické proteiny. Společně tyto receptory rozpoznávají molekulární vzorce spojené s patogeny (PAMP) z mikroorganismů, nebo molekulární vzorce spojené s nebezpečím poškození tkání (O'Neill et al. 2013). Lze tedy uvažovat, že gastrointestinální trakt obsahuje převážnou většinu mikrobů nacházejících se v lidském těle, protože nejvyšší koncentrace těchto receptorů se nachází právě zde (Mowat & Agace 2014). Je potvrzeno, že ztráta imunitní tolerance, je spojena se zánětlivou reakcí na střevě. Je zajímavé, že nedávné údaje ukazují akumulaci T-lymfocytů ve střevech pacientů trpících obezitou a konzumujících stravu s vysokým obsahem tuku (Monteiro-Sepulveda et al. 2015). Na druhou stranu, cirkulace dalších imunitních buněk, jako jsou invariantní T-lymfocyty spojené se sliznicí (vrozené T-lymfocyty) zodpovědné za zvýšenou produkci cytokinů Th1 a Th17, je u pacientů s obezitou a diabetem 2. typu silně snížena (Magalhaes et al. 2015).

Kromě specifických změn ve složení střevní mikrobioty se nyní připouští, že k translokaci bakteriálních sloučenin ze střevního lumenu do těla přispívá několik klíčových faktorů. Za normálních podmínek je funkce střevní bariéry vysoce účinná, a to převážně díky složitým mechanismům – proteinům udržujícím těsné spojení, tloušťce a složení vrstvy hlenu, přítomnosti antimikrobiálních faktorů, intraepiteliálním lymfocytům, dalším adaptivním imunitním buňkám a produkci imunoglobulinu A (IgA) (König et al. 2016; Wells et al. 2016). Imunitní systém zde hraje důležitou roli v modulaci složení mikrobioty a i přesto, že jsou buňky gastrointestinálního traktu neustále vystavovány těmto vlivům, žijeme s mikroorganismy v dokonalé symbióze (Cani 2018). Střevní bariéra je tak řízena sladěnou komunikací mezi střevními mikroby a hostitelským imunitním systémem. Složitost těchto interakcí představuje problém, proč nejsme zcela schopni vyvinout konkrétní terapeutické cíle (Cani 2018).

### **3.2.2 Složení střevní mikrobioty**

Složení střevní mikrobioty je silně ovlivněno způsobem stravování člověka. Pokud budeme konzumovat striktně živočišnou, či striktně rostlinnou stravu, mikrobiota se během pouhých 24 hodin zcela přemění a její navrácení do normálního stavu potrvá dalších 48 hodin (David et al. 2014). Stejně jako u lidí, tak i u zvířat je prokázáno, že pokud je organismus v těžkém stresu a zánětu, například vyvolaném těžkým popálením, dochází k akutním změnám střevního mikrobiomu během jediného dne (Singh et al. 2017).

Externí faktory, jako je spotřeba antibiotik, skladba potravy, psychický a fyzický stres a faktory hostitele mohou vyvolat takzvanou střevní dysbiózu ve střevním mikrobiomu. Dysbióza pravděpodobně zhorší normální fungování střevní mikrobioty při udržování zdraví hostitele. Tento stav vede k rozvoji některých mikrobů, včetně patobiontů, a může vést v neregulovanou produkci metabolitů, které mohou být pro hostitele škodlivé a vyústit tak v řadu onemocnění na místním, systémovém nebo vzhledovém orgánu (Kho & Lal 2018).

Strava tedy představuje jeden z nejdůležitějších faktorů, kterým sám člověk ovlivňuje skladbu střevní mikrobioty a je nezbytné k ní přistupovat zodpovědně. Konzumace vyváženého poměru tuků, sacharidů a bílkovin je klíčová, neboť každá jednotlivá živina ovlivňuje naši mikrobiotu rozdílně.

### 3.2.3 Vliv stravy na střevní mikrobiom člověka

V roce 1977 byly poprvé popsány účinky bílkovin přítomných ve stravě na střevní mikrobiotu. V tomto roce bylo prokázáno, že subjekty konzumující stravu s vysokým podílem hovězího masa měli nižší počty *Bifidobacterium adolescentis* a zároveň vyšší počty *Bacteroides* a *Clostridií*, na rozdíl od subjektů konzumujících bezmasou stravu (Hentges et al. 1977). Od té doby potvrdila celá řada dalších studií (Cotillard et al. 2013; Clarke et al. 2014; David et al. 2014), že spotřeba bílkovin pozitivně koreluje s celkovou mikrobiální rozmanitostí. Například zvýšená spotřeba syrovátky a proteinu hrachu zvyšuje podíl komenzálních druhů *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*, a zároveň snižuje počty patogenních *Bacteroides fragilis* a *Clostridium perfringens* (Dominika et al. 2011). Hrachový protein současně zvyšuje hladiny mastných kyselin s krátkým řetězcem ve střevě, které jsou důležité pro udržení slizniční bariéry a působí protizánětlivě (Kim et al. 2014). Naopak bylo zaznamenáno, že počty anaerobních mikrobů tolerantních vůči žluči, jako například *Bilophila* a *Alistipes*, se zvyšují s konzumací živočišného proteinu (Cotillard et al. 2013; David et al. 2014). Konzumace červeného masa může zvyšovat produkci proatherogenního trimethylamin-N-oxidu, produkovaného několika mikrobiálními rody, který zvyšuje riziko kardiovaskulárních onemocnění (De Filippis et al. 2016). Dlouhodobé konzumování stravy založené převážně na proteinech živočišného původu může vést ke zvýšení rizika onemocnění tlustého střeva. Také je důležité si uvědomit, že se jedná zároveň o stravu bohatou na živočišné tuky (Singh et al. 2017).

Předpokládá se, že konzumace vysoce nasycených a trans-mastných kyselin zvyšuje riziko kardiovaskulárních onemocnění, zvýšením regulace celkového krevního LDL cholesterolu (low density lipoproteins). Typická západní strava má právě toto složení a z větší části postrádá zdraví podporující mono a polynenasycené mastné kyseliny, proto predisponuje běžné spotřebitele k mnoha zdravotním problémům (Singh et al. 2017). Strava s vysokým obsahem tuků zvyšuje celkovou anaerobní mikrobiotu a počty zástupců *Bacteroides* (Fava et al. 2013; Clarke et al. 2014). Dle (Fava et al. 2013) vede konzumace nízkotučné stravy k vyššímu výskytu zástupců *Bifidobacterium* a současnému snížení hladiny glukózy a celkového cholesterolu. Strava s vysokým obsahem nasycených mastných kyselin zvyšuje relativní podíl *Faecalibacterium prausnitzii*. Pacienti konzumující stravu s vysokým obsahem mononenasycených mastných kyselin mají sníženou bakteriální zátěž, nevykazují žádné známky většího pomnožení některého z mikrobů a zároveň mají snížené celkové plazmatické a nízkodenzitní lipoproteiny (Fava et al. 2013; Singh et al. 2017).

Sacharidy mají schopnost modifikovat střevní mikrobiom. Existují ve dvou variantách jako stravitelné a nestravitelné. Stravitelné sacharidy se v tenkém střevě enzymaticky odbourávají a zahrnují škroby a cukry, jako je glukóza, fruktóza, sacharóza a laktóza. Po degradaci se uvolní glukóza do krevního řečiště a stimuluje inzulínovou odpověď (Saltiel 2016). Pacienti přijímající vysokou dávku glukózy, fruktózy a sacharózy ve formě datlí, vykazují zvýšenou hojnost zástupců *Bifidobacterium* a *Bacteroides* (Singh et al. 2017). Přidáním laktózy do stejné stravy bohaté na výše zmíněné sacharidy vedlo ke stejným

bakteriálním posunům, a také redukovalo zástupce *Clostridií*. Zároveň bylo prokázáno, že vyšší konzumace laktózy vedla ke zvýšenému výskytu mastných kyselin s krátkým řetězcem ve stolici (Francavilla et al. 2012). Tento fakt se stává poměrně zajímavým, neboť laktóza je považována za potenciální dráždivo v zažívacím traktu (Singh et al. 2017). Umělá sladidla jako jsou sacharin, sukralóza a aspartam mají také vliv na skladbu střevní mikrobioty a představují ve výživě spor. Původně byla na trh uváděna jako zdravotně nezávadná alternativa bez kalorií, kterou lze nahradit přírodní cukr. Ve skutečnosti, se dle výzkumu (Suez et al. 2014) ukazuje, že konzumace umělých sladidel pravděpodobně vyvolává intoleranci glukózy spíše, než konzumace čisté glukózy a sacharózy. Předpokládá se, že se tak děje díky změně střevní mikrobioty vyvolané konzumací umělých sladidel. Toto tvrzení bylo potvrzeno při pokusech na myších, kdy dochází k dysbióze střevního mikrobiomu se zvýšeným výskytem zástupců *Bacteroides* a snížení počtu zástupců *Lactobacillus reuteri* (Suez et al. 2014). Tyto mikrobiální posuny jsou přímo v rozporu s těmi, které jsou vyvolány příjmem přírodních cukrů. Ukazuje se, že na rozdíl od všeobecného přesvědčení, může být konzumace umělých sladidel ve skutečnosti méně zdravá než konzumace přírodních cukrů (Singh et al. 2017).

Na rozdíl od zmíněných stravitelných sacharidů nejsou nestravitelné sacharidy v tenkém střevě plně štěpeny. Nestravitelné sacharidy jako je vláknina, putují do tlustého střeva, kde jsou pomocí fermentace rezidentní mikrobiotou štěpeny. Mikroorganismy vlákninu mohou využít k poskytnutí energie a jako zdroj uhlíku pro hostitele (Lozupone et al. 2012; Sonnenburg & Sonnenburg 2014; Pistollato et al. 2016). Nestravitelné sacharidy jsou v tomto procesu schopné modulovat střevní prostředí. Tato vlastnost vláken zaručuje jejich označení jako probiotika, ze své podstaty nestravitelné složky stravy, která přispívá ke zdraví hostitele prostřednictvím stimulace a růstu aktivity některých mikroorganismů (de Vrese & Schrezenmeir 2008). Mezi zdroje potravin s probiotickou aktivitou patří sójové boby, inulin, nerafinovaná pšenice a ječmen, syrový oves a nestravitelné oligosacharidy, jako například fruktany, polydextróza, fruktooligosacharidy, galaktooligosacharidy, xylanové oligosacharidy a arabino oligosacharidy (Pandey et al. 2015a). Bylo prokázáno, že strava s nízkým obsahem těchto látek, snižuje celkový počet bakterií střevní mikrobioty (Halmos et al. 2015). Diety založené na nestravitelných sacharidech, bohaté na celozrnné a pšeničné otruby, vykazují zvýšení počtu *Bifidobakterium* a *Lactobacillus* ve střevech (Carvalho-Wells et al. 2010). Rezistentní škrob, další příklad nestravitelného sacharidu, zvyšuje hojnost mikroorganismů, jako jsou *Ruminococcus*, *Eubacterium rectale* a *Roseburia* (Leitch et al. 2007; Keim & Martin 2014). Je pozorováno, že probiotika na bázi fruktooligosacharidů, polydextrózy a arabino oligosacharidů snižují počty druhů *Clostridium* (Costabile et al. 2012; Liu et al. 2014) a *Enterococcus* (François et al. 2014). Prebiotika mají příznivý účinek na imunitní a metabolické funkce ve střevě pomocí zvýšené produkce mastných kyselin s krátkým řetězcem a posílením gastrointestinální lymfatické tkáně fermentací vláken (West et al. 2013; Singh et al. 2017).

### 3.2.4 Funkce střevní mikrobioty

Symbiotický vztah mezi střevní mikrobiotou a hostitelem je regulován a stabilizován komplexní sítí interakcí, které zahrnují metabolické, imunitní a neuroendokrinní komunikace mezi nimi. Tato komunikace je potenciálně zprostředkována mikrobiálně syntetizovanými metabolity, které vykazují pleiotropní účinky. Zároveň fungují jako signální molekuly při regulaci neuroimunitně zánětlivých os hostitele, které by mohly fyziologicky spojovat střeva

s jinými orgánovými systémy (Kho & Lal 2018). Analýza vzorků lidské stolice pomocí 16S ribozomální RNA a techniky metagenomického sekvenování odhalila významné obohacení metabolismu polysacharidů, aminokyselin, xenobiotik a mikroživin způsobené střevní mikrobiotou. Toto zjištění naznačuje, že tyto původní mikroby usnadňují získávání energie hostitele a metabolickou účinnost (Gill et al. 2006). Střevní mikrobiota je důležitá při fermentaci neabsorbovaného škrobu a rozpustné vlákniny. Fermentované konečné produkty jsou ve formě mastných kyselin s krátkým řetězcem (SCFA). Tyto SCFA jsou ve formě butyrátu, propionátu a acetátu a působí jako jeden z energetických zdrojů pro hostitele a tvoří zhruba 10 % denní energie získané z výživy a využitelné hostitelem pro další metabolické procesy (Payne et al. 2012). Mikrobiálně syntetizované SCFA se podílejí na 70 % ATP syntetizovaného v tlustém střevě, přičemž butyrát je preferovaným zdrojem energie pro kolonocyty (Donohoe et al. 2011). Kromě toho bylo prokázáno, že SCFA jsou ligandy pro receptor 41 spřažený s G proteinem (GPR41), který je exprimovaný podskupinou střevních epiteliálních endokrinních buněk, které regulují energetickou homeostázu stimulací produkce leptinu. Leptin produkovaný těmito buňkami má vliv na širokou škálu fyziologických funkcí hostitele, například energetický metabolismus, chuť k jídlu, aktivitu sympatického nervu a imunitní odpověď. Toto všechno může vést k interaktivní signalizaci mezi hostitelem a mikrobiotou (Samuel et al. 2008). Příznivě na hostitele i mikrobiotu působí také další metabolity produkované střevní mikrobiotou, například mikroživiny jako jsou vitamíny. Střevní bakterie *Bacteroides fragilis*, *Eubacterium lentum*, *Enterobacter agglomerans*, *Serratia marcescens* a *Enterococcus faecium* produkují vitamín K, pomocí anaerobní syntézy menachinonu, který je nezbytný při snižování kalcifikace cév a zvyšování hladiny HDL cholesterolu, čímž přispívají ke snížení rizika kardiovaskulárních poruch, jako jsou ateroskleróza a ischemická choroba srdeční (Geleijnse et al. 2004; Cooke et al. 2006). Pro hostitele slouží střevní mikrobiota jako důležitý zdroj vitamínu B (Degnan et al. 2014). Mezi nimi jsou nejvýznamnější vitamíny B5 a B12, které jsou syntetizovány výhradně střevní mikrobiotou a působí jako koenzymy pro širokou škálu biochemických procesů hostitele, včetně produkce acetylcholinu a kortizolu, které jsou zcela nezbytné pro normální fungování nervového systému. Nedostatek těchto dvou vitamínů má za následek několik poruch, například nespavost, gastrointestinální potíže, neuropsychologické a hematologické poruchy (Gominak 2016). Avšak přímá souvislost mezi ztrátou střevní mikrobioty produkující vitamíny a nástupem onemocnění nebyla dosud plně objasněna (Kho & Lal 2018). Střevní mikrobiota také hraje významnou roli v ko-metabolismu žlučových kyselin hostitele (Staels & Fonseca 2009).

Fyzická a imunologická funkce střevní bariéry je křížově regulována interakcemi mezi hostitelem a střevní mikrobiotou. Tyto interakce jsou zodpovědné za regulaci rovnováhy gastrointestinálních T-lymfocytů (poměr regulačních T-lymfocytů a pomocných T – typů), která je zásadní pro udržení intestinální homeostázy. Ta zajišťuje rozlišování mezi patogeny a komenzálními mikroby prostřednictvím organizace „imunitní tolerance a produktivní imunitní reakce“. Bylo zjištěno, že právě střevní mikrobiota hraje významnou roli v udržování a regulaci toho mechanismu. Některé komenzální mikroby, jako *Bacteroides fragilis*, *Bifidobacterium infantis* a *Firmicutes*, jsou schopné indukovat expanzi regulačních T-lymfocytů, například FOXP3 exprimující regulační T-lymfocyty a protizánětlivé regulační T-lymfocyty produkující IL-10, které jsou zásadní pro potlačení patologického zánětu



vyvolaného aberantními efektorovými T-lymfocyty. Jedná se o důkaz, že střevní mikrobiota posiluje funkci střevní bariéry (Paust et al. 2004; El Aidy et al. 2012; Lawley & Walker 2013). Potlačení zánětlivé reakce regulačními T buňkami hraje klíčovou roli při vyvolání tolerance hostitele na buňky, které mu nejsou vlastní. To umožňuje střevní mikrobiotě rozvinout vlastní kolonie a usadit se, aniž by byla napadána hostitelovým imunitním systémem. Dále se v této souvislosti podařilo prokázat, že některé další metabolity mikrobioty, jako například SCFA, poskytují ochranu integrity gastrointestinální bariéry proti rušivým účinkům prozánětlivých cytokinů způsobených aberantní imunozánětlivou osou (Peng et al. 2007; Chen et al. 2017).

Další důkazy, které zkoumají vliv metabolitů mikrobioty na hostitele ukazují, že se většinou jedná o vazbu na specifické hostitelské membrány nebo jaderné receptory (Husted et al. 2017; Brown & Hazen 2018; Rastelli et al. 2018). Z mnoha metabolitů produkovaných mikrobiotou patří mezi nejvýznamnější foláty, indoly, sekundární žlučové kyseliny, trimethylamin-N-oxid (TMAO), dále některé neurotransmitery (serotonin) a nakonec SCFA jako butyrát, propionát a acetát. Tyto SCFA jsou rozpoznávány receptory spřaženými s G-proteinem, jako například GPR-41 a GPR-43 (Cani 2018). Stimulace těchto receptorů spouští sekreci střevních peptidů podílejících se na metabolismu glukózy nebo příjmu potravy, jako je peptid-1 podobný glukagonu, nebo peptid YY (PYY) (McKenzie et al. 2017). Díky tomu, že mikrobiota dokáže stimulovat endokrinní buňky k produkci hormonů, je tak schopna ovlivňovat na dálku chod některých orgánů (Brooks et al. 2017; Postler & Ghosh 2017). Pozoruhodné je, že propionát produkovaný mikrobiotou reguluje produkci antimikrobiálních faktorů imunitními buňkami, a proto může působit jako imunitní regulátor (Maslowski et al. 2009). Toto poukazuje na fakt, že jeden metabolit mikrobioty může hrát v hostitelském metabolismu různou roli, od regulace hladiny glukózy, po imunomodulační účinky (Cani 2018).

V nedávné době (Cani 2017) bylo zjištěno, že butyrát produkovaný mikrobiotou silně ovlivňuje mikrobiální prostředí a ekologii, komunikací s hostitelskými buňkami. Butyrát dává pokyn buňkám tlustého střeva „dýchat“ kyslík aktivací  $\beta$ -oxidace, aby ochránil hostitele před rozvojem a expanzí potenciálně patogenních bakterií do lumenu střeva (Cani 2017). Získané informace naznačují, že extrémně nízké množství kyslíku přítomného v luminálním obsahu střev (tj. anaerobním stavu) je podmínkou, která je nutná k zabránění expanze domnělých fakultativních anaerobních patogenů, jako jsou *Salmonella* a *Escherichia* (Rivera-Chávez et al. 2017). To znamená, že se autorům podařilo prokázat, že spotřeba kyslíku hostitelskou buňkou pomocí  $\beta$ -oxidace butyrátu v mitochondriích vyprodukovaného střevní mikrobiotou přispívá k omezení difúze kyslíku z buněk tlustého střeva do luminálního kompartmentu, což má za následek udržení anaerobních podmínek a zamezení fakultativním anaerobům se rozvinout (Cani 2017; Cani 2018).

Neopominutelnou funkcí střevního mikrobiomu je kolonizační rezistence. Původní mikrobiota poskytuje hostiteli ochranu před kolonizací patogenního útočnicka a prevenci přemnožení patogenních členů mikrobioty, takzvaných patobiontů. Tomuto stavu dochází tak, že mikrobiota přímo interaguje s hostitelem, kdy využívá nebo posiluje obranné zdroje hostitele, nebo je s patogeny v kompetici o sdílené niky a živiny. Během pertrubace střevního mikrobiomu však dochází ke snížení dominantních členů mikrobiomu a snižuje se tak kapacita rezistence na kolonizaci, což má za následek umožnění některým oportunním patogenním kmenům napadnout, nebo kolonizovat prázdná místa, a může vyústit v infekci. Příkladem

oportunitního patogenu je *Clostridium difficile* (Kho & Lal 2018). Z důvodu zvýšení schopnosti rezistence kolonizace patogenních mikroorganismů, může suplementace probiotických mikroorganismů hrát významnou roli.

### 3.3 Probiotika

Definice slova probiotikum se od jeho prvního použití několikrát obměnila. V současnosti definujeme probiotika podle Světové zdravotnické organizace (WHO) a Organizace pro výživu a zemědělství (FAO) jako živé mikroorganismy převážně lidského původu, které jsou schopny v určitém množství příznivě působit na zdraví člověka. Jsou schopna příznivě regulovat střevní prostředí a předcházet některým nemocněním (McFarland 2015; Gasbarrini et al. 2016). Pokud označujeme jako probiotikum potraviny, jedná se o potraviny obohacené o modulační mikroorganismy (Goossens et al. 2006; Matsumoto et al. 2010).

#### 3.3.1 Význam probiotik

Fermentované potraviny obsahující bakterie mléčného kvašení, jako jsou jogurty a další mléčné výrobky obsahující kultury, představují zdroj požitelných mikroorganismů, které mohou příznivě regulovat zdraví střev a dokonce léčit nebo předcházet zánětlivým onemocněním střev (Shen et al. 2014). Předpokládá se, že jsou toho schopna dosáhnout svým působením na existující střevní mikrobiotum, například indukci protizánětlivých cytokinů, jako je IL-10 (Foligné et al. 2016). Randomizovaná placebem kontrolovaná studie na dospělých subjektech stravovaných probiotiky obsahujícími tři kmeny *Bifidobacterium*, čtyři kmeny *Lactobacillus* a jeden kmen *Streptococcus* ukázala, že došlo k významnému zvýšení koncentrace celkových aerobů, anaerobů, zástupců *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a *Streptococcus*. Zároveň se ukázalo, že tito jedinci měli menší počet celkových koliformních bakterií a *Escherichia coli*, snížené triglyceridy, celkový cholesterol a vysoce citlivý C-reaktivní protein (hsCRP) (Rajkumar et al. 2014). Bylo také prokázáno, že jogurt obsahující probiotické mikroorganismy významně snižuje počty enteropatogenů *Escherichia coli* a *Helicobacter pylori* (Liu et al. 2010; Yang & Sheu 2012).

Konzumace fermentovaných mléčných výrobků obsahujících probiotika, má další zdravotní přínosy, zmírnění symptomů gastrointestinálních intolerancí (del Campo et al. 2014; Kwak et al. 2014; Yoon et al. 2015), zrychlení střevního tranzitního času, zvýšení celkového sérového imunoglobulinu A (IgA) zesilujícího humorální imunitní odpověď (Yang & Sheu 2012; Akatsu et al. 2013), inhibici adheze patogenů ve střevní sliznici (Collado et al. 2007) a snížení břišní distenze a ascitů u pacientů s chronickým onemocněním jater (Liu et al. 2010). Probiotické kmeny *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, jsou úspěšně používány k profylaktické prevenci cestovatelského průjmu (McFarland 2007; Singh et al. 2017).

**Tabulka 1:** Příklady vlivu probiotických kmenů na různá onemocnění člověka (Azad et al. 2018).

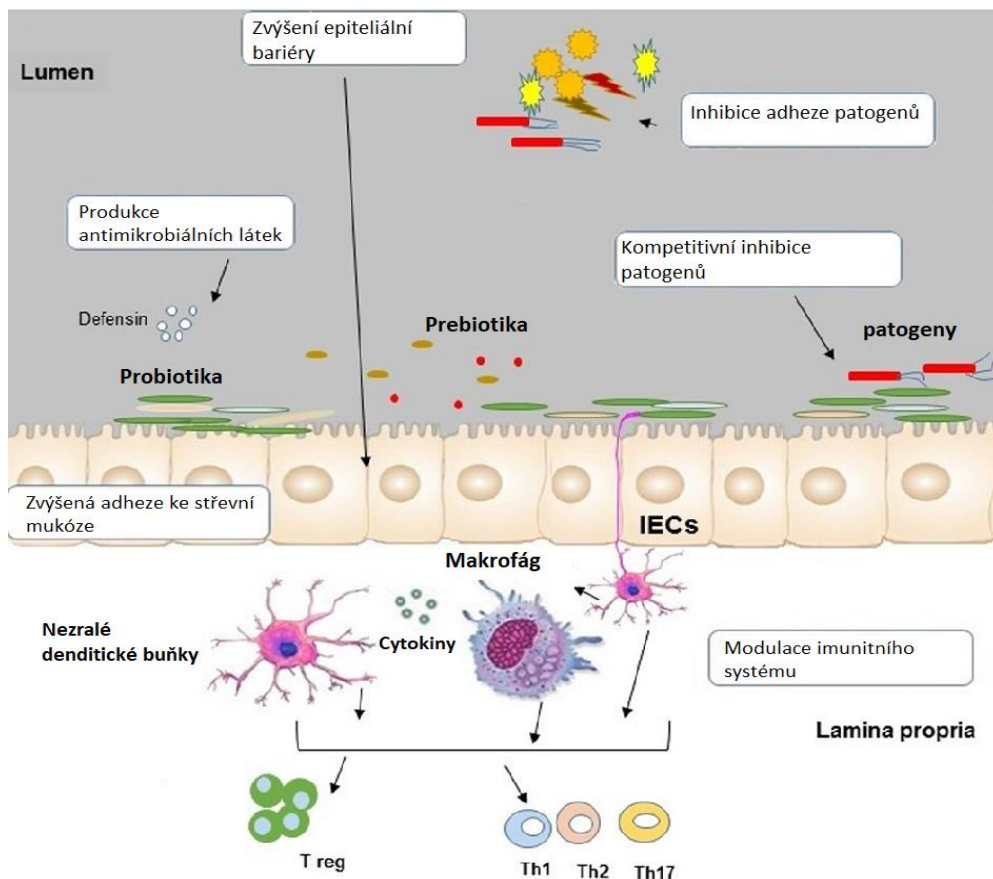
Probiotický kmen	Onemocnění	Výsledný vliv probiotika
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Zánětlivá onemocnění střev	↑ IL-10, Treg; ↓ IL-6, IL-1β, IL-17
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Kolorektální karcinom	↑ IL-10, IL-12; ↓ Treg
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Krohnova choroba	↑ IL-17; ↓ funkce Th17, IL-23
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Ulcerativní kolitida	↑ Lactobacily, Bifidobacteria; ↓ <i>Streptococcus aureus</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	Kolorektální karcinom	↑ Th17, Th22, IL-10, IL-22; ↓ Treg
<i>Lactobacillus fermentum</i>	Hypocholesterolémie	↑ Lactobacily
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	Akutní poškození jater	↑ IL-22, Lactobacily
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Oxidativní stres	↑ <i>Bacteroidetes</i> , <i>Firmicutes</i>
<i>L. acidophilus</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>B. bifidum</i>	Diabetes druhého typu	↑ <i>Firmicutes</i> , <i>Actinobacteria</i> ; ↓ <i>Bacteroidetes</i>
<i>Bifidobacterium breve</i>	Záněť	↑ IL-8, IL-10, IL-12
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	Chronické záněty	↑ IL-10, soudržnost střevní bariéry; ↓ IL-17
<i>Sacharomyces boulardii</i>	Akutní selhání jater	↑ <i>Bacteroidetes</i> ; ↓ <i>Firmicutes</i> , <i>Proteobacteria</i>
<i>Sacharomyces boulardii</i>	Diabetes druhého typu	↑ <i>Firmicutes</i> , <i>Proteobacteria</i> , <i>Fibrobacteria</i>
<i>Enterococcus hirae</i>	Nádorové onemocnění	↑ buněčná odpověď na Th 17

Th – druh pomocných T lymfocytů; IL – interleukin, druh humorálních signálních molekul, cytokinů; ↑ - zvyšuje; ↓ - snižuje.

### 3.3.2 Vlastnosti probiotik

Pokud jsou probiotické mikroorganismy konzumovány v dostatečném množství, jsou schopny odolat fyziologickým podmínkám v gastrointestinálním traktu člověka a mohou tak hrát svoji roli v podpoře zdraví hostitele. Příznivé působení je prokázáno u některých poruch, jako je průjem, alergie, zánětlivá onemocnění střev, malabsorpce laktózy a nekrotizující enterokolitida u předčasně narozených dětí (Yousefi et al. 2019). Probiotika mají četné účinky na gastrointestinální lymfatickou tkáň. Mezi tyto účinky patří kompetitivní eliminace patogenů. Probiotika jsou toho schopna díky řadě mechanismů, jako je zvýšení integrity epitelální bariéry, zvýšení adheze ke střevní sliznici, inhibice adheze patogenních mikroorganismů, produkce antimikrobiálních látek, modulace dendritických buněk a vliv na polaritu T-buněk (Hidalgo-Cantabrana et al. 2014; Yousefi et al. 2019). Mechanismy působení probiotik shrnuje obrázek 2.

Má-li se projevit pozitivní působení probiotik na lidské zdraví, musejí projít celým trávicím systémem až do střev nepoškozená. Vlastnost odolat kyselému pH žaludku a trávicím šťávám v duodenu je tedy nepostradatelná. Poté, co odolají extrémnímu prostředí žaludku a dvanáctníku, musí úspěšně adherovat na střevní epitel (McFarland 2015).



**Obrázek 2:** Hlavní mechanismy působení probiotik. (IECs – intestinální epiteliální buňky) (Yousefi et al. 2019)

Kompetitivní inhibice funguje díky schopnosti probiotických mikroorganismů zamezit přístupu patogenních organismů k živinám, nebo díky zablokování vstupu do kolonizačního prostoru preferovaného patogeny (Rattanachaikunsopon & Phumkhachorn 2010). Během této kompetice o živiny produkují probiotické mikroorganismy metabolity, jako například těkavé mastné kyseliny, které jsou schopné snížit pH prostředí (Ceapa et al. 2013). Většina patogenních organismů není schopná se v tomto prostředí množit, a dochází tak k jejich inhibici. Probiotika mají schopnost navázat se ve velkém množství na buňky střevního epitelu elektrostatickými interakcemi, sférickými silami, nebo specifickými povrchovými proteiny, čímž dokážou zablokovat kolonizaci patogenů v těchto místech. Jedná se o kompetici o prostor v kryptách tlustého střeva, pohárových buňkách a ve střevních klících. Jakmile je probiotický organismus navázán na zmiňovaná místa, přímo je zablokuje a tím inhibuje schopnost patogenů adherovat do těchto míst. Například bakterie mléčného kvašení (LAB) vykazují oproti patogenům vyšší schopnost adherence k epitelovým buňkám (Juntunen et al. 2001; Amalaradjou & Bhunia 2013; Amara & Shibl 2015; Mathipa & Thantsha 2017). Za účelem získání konkurenční výhody při kompetici o prostor a živiny uvolňují mikroorganismy antimikrobiální a jiné látky. Tyto látky mohou mít přímé inhibiční účinky na konkrétní patogen, nebo mohou pracovat spolu s dalšími látkami (Volzing et al. 2013). Mezi antimikrobiální látky vylučované probiotickými mikroorganismy patří octová a mléčná kyselina. Organické kyseliny, mimo snižování pH, ovlivňují metabolismus patogenních organismů a v konečném důsledku tak předcházejí některým nemocem vyvolaným patogeny (Mathipa & Thantsha 2017). Antipatogenní aktivita probiotik je multifaktoriální (Servin 2004). Probiotika produkují mimo

zmíněné kyseliny další metabolity s antimikrobiální aktivitou, například peroxid vodíku, nebo bakteriociny (Vilà et al. 2010; Dobson et al. 2012). Bakteriociny jsou malé antimikrobiální peptidy produkované pro mikrobiální konkurenci v přirozeném ekosystému. Mohou působit jako kolonizující peptidy tím, že usnadňují zavádění probiotických mikroorganismů do již obsazených výklenků střevního epitelu. Tato konkurenční výhoda ve výsledku umožní zvýšení hustoty probiotických bakterií na povrchu střev hostitele (Dobson et al. 2012). Mimo usnadnění kolonizace probiotických bakterií působí přímo inhibičně na patogeny (Mathipa & Thantsha 2017). Studie (Kim et al. 2003) hodnotila antimikrobiální aktivitu bakteriocinů lacticinu, pediocinu a leucocinu, které jsou produkovány bakteriemi mléčného kvašení proti *Helicobacter pylori*. Výsledky studie ukázaly, že tyto bakteriociny byly schopny významně inhibovat růst *H. pylori*, přičemž nejvyšší inhibiční účinek vykazoval právě laktát (Mathipa & Thantsha 2017).

Další mechanismus účinku probiotických mikroorganismů je schopnost stimulace imunity hostitele, která následně útočí na patogenní organismy. Modulují imunitní systém hostitele proti patogenům aktivací lymfocytů a tvorbou protilátek. Stimulují zároveň další buňky podílející se na vrozené a adaptivní imunitě, například dendritické buňky, makrofágy, T buňky a B buňky (Hardy et al. 2013). Probiotické kmeny, jako jsou *L. rhamnosus* a *L. plantarum* adherují ke střevní lymfatické tkáni a zvyšují tak systémovou i slizniční imunitu (Behnsen et al. 2013). Ke zvýšení funkce imunity dochází díky stimulaci produkce střevních mucinů (MUC2 a MUC3). Díky tomu je narušena přilnavost patogenů k intestinálnímu epitelu a narušena jejich schopnost translokace. V neposlední řadě indukují expresi TGF $\beta$  a interleukinů (IL-10 a IL-6) epiteliálními buňkami, což vede ke zvýšené produkci a sekreci IgA (Hardy et al. 2013; Mathipa & Thantsha 2017). Tabulka 2 ukazuje mechanismy účinků vybraných probiotických kmenů a jejich výsledné funkce.

Je tedy nezbytné zachovat integritu střevní bariéry, aby se zabránilo průniku patogenů do střevních buněk a případné způsobené infekci. Tuto integritu mají schopnost udržovat právě probiotika, která mohou i opravovat a pomocí stimulace buněk i bránit. K narušení integrity dochází v důsledku disbiózy střevní mikrobioty (Ohland & MacNaughton 2010; Wohlgemuth et al. 2010). Integrita střevní bariéry je také udržována a chráněna pohárkovými buňkami, které exprimují tyčinkovité muciny (MUC), které jsou vylučovány do lumenu za vzniku slizniční vrstvy, nebo lokalizovány na buněčné membráně. Člověk exprimuje 18 glycinů mucinového typu (Culligan et al. 2009). V lidských intestinálních buněčných liniích druhu *Lactobacillus* zvyšují expresi mucinu (MUC2 buněčnými liniemi Caco-2; MUC2 a MUC3 buněčnými liniemi HT29), čímž blokují buněčnou adhezi a invazi patogenními *E. coli* (Mathipa & Thantsha 2017).

**Tabulka 2:** Přehled mechanismů účinků vybraných probiotických kmenů a jejich výsledné funkce (Mathipa & Thantsha 2017).

Mechanismus účinku	Probiotický mikroorganismus	Patogen	Funkce
Kompetitivní vyloučení	<i>L. acidophilus</i> ; <i>L. johnsonii</i>	Enteropatogenní <i>E. coli</i> , <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	Inhibice adherence patogenů na Caco-2 buňky
	<i>L. casei subsp. thamnusus</i>	Enteropatogenní <i>E. coli</i> , Enterotoxikogenní <i>E. coli</i> , <i>Kleibselia pneumoniae</i>	Inhibice adherence patogenů na Caco-2 buňky
	<i>L. rhamnosus</i> ; <i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	Inhibice adherence patogenů na T-84 epiteliální buňky; inhibice kolonizace na Caco-2 buňky
Produkce inhibičních látek	<i>L. acidophilus</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	Produkce lacticinu
	<i>L. lactis</i>	<i>E. coli</i> ; <i>Salmonella</i>	Produkce alyteserinu-1a
	<i>B. longum</i>	<i>Clostridium difficile</i> ; <i>E. coli</i>	Produkce bakteriocinu
	<i>L. salivarius</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Produkce bakteriocinu Abp118
	<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Produkce sakacinu A
	<i>L. plantarum</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Produkce plantaricinu
	<i>L. lactis</i>	<i>Clostridium difficile</i>	Produkce lacticinu 3147
Modulace imunitního systému	<i>L. lactis</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	Snížení schopnost růstu patogenů produkcí kyseliny mléčné
	<i>L. reuteri</i>	<i>Salmonella</i>	Zvýšená produkce IgM
	<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	Zvýšená produkce IgA a zvýšení fagocytózy krevních leukocitů
Zlepšení funkce střevní bariéry	<i>L. acidophilus</i>	<i>S. typhimurium</i>	Zvýšená produkce IgA
	<i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	Zvýšení produkce MUC2 a MUC3 HT-29 buňkami
	<i>S. thermophilus</i> ; <i>L. acidophilus</i>	Enteroinvazivní <i>E. coli</i>	Zvýšená transepiteliální rezistence

IgA/M – imunoglobulin A/M; Caco-2 a HT-29 – buňky kolorektálního adenokarcinomu; MUC2/3 – glykoproteiny muciny.

### 3.3.3 Probiotické organismy

Probiotické mikroorganismy musejí splňovat několik faktorů, aby mohly být lidmi konzumovány. Musejí být klasifikovány jako bezpečné, tedy nepoškozující lidské zdraví, jsou geneticky stálé a příznivě působí na lidské zdraví. Nesmí se jednat o patogenní mikroorganismy a o látky vyvolávající alergickou reakci (Butel 2014; Pandey et al. 2015b). Z těchto důvodů prochází přísným schvalovacím procesem. Následné zpracování mikroorganismů na přípravek, užívaný lidmi, podléhá podobným kritériím. Přípravek musí být bezpečný, čistý a stabilní (Jackson et al. 2019). Převážná většina užívaných probiotických mikroorganismů jsou gram-pozitivní bakterie. Nalezneme i gram-negativní, například *Eschericia coli Nissle* (Behnsen et al. 2013). Mezi nejužívanější rody probiotických organismů řadíme rody *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Pedicoccus* a *Leuconostoc* (Vasijevic & Shah 2008).

Mezinárodní vědecká asociace probiotik a probiotik (ISAPP) ve svém prohlášení z roku 2018 uvádí, že z důvodu častého zneužívání pojmu „probiotikum“, zavádí několik kritérií, která musí potenciální probiotický kmen splňovat, aby mohl nést označení probiotikum. Kmen musí být dostatečně charakterizován, jeho použití musí být bezpečné, existuje alespoň jedna vědecká studie potvrzující pozitivní vliv na lidské zdraví, která byla provedena podle obecně přijímaných vědeckých standardů, kmen je ve výrobku živý a v účinné dávce po celou dobu použitelnosti (Binda et al. 2020).

### 3.3.4 *Lactobacillus* spp.

Rod *Lactobacillus*, který taxonomicky řadíme do kmene *Firmicutes*, třídy *Bacilli*, řádu *Lactobacillales* a čeledi *Lactobacillaceae*, se skládá z více než 170 druhů fakultativních, anaerobních, kataláza negativních, grampozitivních a nesporotvorných tyčinek (Kleerebezem & Vaughan 2009). Laktobacily jsou po staletí využívány při výrobě fermentovaných potravin jak zvířecího, tak rostlinného původu. V dnešní době jsou jedním z nejvyužívanějších probioticky aktivních mikroorganismů. Množství laktobacilů nalezených v gastrointestinálním traktu se liší v závislosti na věku hostitele, stavu střev a dalších parametrech. Převládajícími původními druhy rodu *Lactobacillus*, které lze nalézt ve výkalech dospělých jedinců jsou *L. gasseri*, *L. reuteri*, *L. crispatus*, *L. salivarius* a *L. ruminis*. V případě kojenců, jsou převládajícími zástupci *L. plantarum*, *L. salivarius*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. delbrueckii* a *L. reuterii* (Lebeer et al. 2008). Nejběžnější zástupci obývající gastrointestinální trakt člověka jsou *L. casei*, *L. plantarum*, *L. fermentum* a *L. rhamnosus*. V žaludku jsou nejvíce zastoupeni *L. antri*, *L. gastricus*, *L. kalixensis*, *L. reuteria* a *L. ultunensis* (Turroni et al. 2014). Zdravý ženský urogenitální trakt obsahuje velký a stabilní podíl *Lactobacillus* spp., který chrání před patogenními infekcemi. Nejběžněji zastoupeni jsou zde *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii*, *L. vaginalis* a *L. iners* (De Gregorio et al. 2014).

Laktobacily mají významný příznivý účinek na růst hostitele, ovlivňují tělesnou hmotnost a velikost (Hamdan et al. 2016; Schwarzer et al. 2016). Někteří zástupci tohoto rodu mohou zlepšit také biologickou dostupnost makro- a mikroživin, které hostitel nedokáže metabolizovat. Děje se tak pomocí úpravy fyziologie střev regulací syntézy růstových faktorů, jako jsou spermidin, vitaminy skupiny B, a vápníku (Turpin et al. 2010). Laktobacily jsou schopné produkovat vitaminy skupiny B, nezbytné pro hostitele, jako jsou vitamin B2, B9 (folát) a B12 (Zhang et al. 2018). Konzumace probiotických laktobacilů může účinně léčit infekční onemocnění způsobená adenoviry, rotaviry a herpes virem simplex typu 1 (Todorov et al. 2008; Yang et al. 2015). U laktobacilů byli objeveny fungistatické vlastnosti, kdy jsou laktobacily schopné účinně bojovat proti těžkým plísňovým onemocněním, zejména v gastrointestinálním traktu (Black et al. 2013; Cortés-Zavaleta et al. 2014). Mnoho těchto antifugálních sloučenin, které inhibují růst a kolonizaci hub, produkovaných laktobacily bylo identifikováno v *in vitro* studiích, například fenylmléčná, hydroxyfenylmléčná a octová kyselina (Zhang et al. 2018).

### 3.3.5 Adheze

Gastrointestinální trakt savců je pokryt hlenem, viskoelastickým gelem, který lemují a chrání intestinální epitel a odděluje jej od obsahu lumen. Tlusté střevo je pokryto dvojrvtvou hlenu, přičemž vnější vrstva poskytuje prostředí pro kolonizaci mikroorganismy, zatímco

vnitřní vrstva je udržuje v bezpečné vzdálenosti od povrchu epitelu. Vnitřní vrstva za normálního stavu tedy žádné mikroorganismy neobsahuje (Johansson et al. 2011). Tloušťka hleny se mění napříč celým traktem, kdy nejsilnější je v tlustém střevě. Tento hlen zachycuje a transportuje bakterie a je bohatým zdrojem živin využívaných při metabolismu a růstu bakterií (Kim & Ho 2010). Hlavní složku hleny představují muciny (MUC), uvolňované, skladované a produkováné pohárovými buňkami. Muciny jsou glykoproteiny, kde 80 % molekulové hmotnosti tvoří glykany. Doposud bylo do rodiny genů MUC přiděleno 20 lidských MUC genů, některé z nich řadíme do rodiny mucinů tvořících vlastní hlen, zatímco ostatní jsou klasifikovány jako muciny přisedlé k membráně (Desseyn et al. 2000; Ringot-Destrez et al. 2018). Expresce mucinů je závislá na orgánech a tkáních. Vrstva hleny v tlustém a tenkém střevě je složena převážně z MUC2. V žaludku nalezneme MUC5AC a MUC6. Lidský MUC2 je potažen více než 100 různými O- vázanými glykanovými řetězci. Mucinové oligosacharidy mohou sloužit jako vazebná místa a zdroje energie pro střevní mikrobiotu. Rozdíly v glykosylaci mucinu stanovené podél střeva a mezi jednotlivci mohou ovlivňovat tropismus některých bakterií pro specifické oblasti gastrointestinálního traktu a také pro specifčnost mikrobioty hostitele (Bennett et al. 2012; Koropatkin et al. 2012; Donaldson et al. 2016).

Kromě glykoproteinů mucinů se v této hlenové vrstvě nachází glykolipidy, elektrolyty a imunoglobuliny, a celou vrstvu označujeme jako glykokalyx (Bron et al. 2012). Bakteriální adheze na střevní povrch je v počátku řízená nespecifickými hydrofobními fyzikálními vazbami jako jsou hydrofobní interakce a následována druhou fází, kdy se uplatňuje adheze specifickými složkami buněčné stěny (Haddaji et al. 2015). Přítomnost některých povrchových proteinů jako jsou proteinázy ukotvené v buněčné stěně, zvyšuje hydrofobicitu a adhezi některých bakterií mléčného kvašení (Muñoz-Provencio et al. 2012; Zhang et al. 2015; Radziwill-Bienkowska et al. 2017). Přítomnost adhesinů v bakteriální buněčné stěně hraje důležitou roli v adhezi bakterií ve střevě. Proteiny vázající hlen jsou povrchové adhezivní proteiny, které obsahují domény Mub a/nebo MucBP (MUCin vázající protein), schopné vázat muciny, a jsou spojeny s buněčnou stěnou peptidoglykanu C-terminálním motivem Leu-Pro-any-Thr-Gly (LPxTG). Ačkoli domény MucBP lze nalézt u různých bakteriálních druhů, včetně některých patogenních jako je *Listeria monocytogenes* (Popowska et al. 2017), domény Mub se téměř výlučně vyskytují u bakterií mléčného kvašení izolovaných z lidského gastrointestinálního traktu (Van Tassell & Miller 2011). Fimbrie a pily (tenká proteinová prodloužení u bakteriálních buněk) podporují adhezi. Pily typu IV byly široce charakterizovány u gramnegativních bakterií. Tyto struktury poskytují bakteriím výhodu pro kolonizaci povrchu sliznic (Hospenthal et al. 2017). Dle (Piepenbrink & Sundberg 2016), se tento typ pil exprimuje i u grampozitivních bakterií jako je například *Bifidobacterium*.

Kromě mukus vázajících proteinů a pil mohou k přilnutí bakterií ke střevní sliznici přispívat i další povrchové proteiny, jako jsou proteiny povrchové vrstvy (SLP) a proteiny vázající fibronektin (FBP). Fibronektin je glykoprotein extracelulární matrix, který se nachází ve střevě v nerozpustné formě. Přítomnost tohoto proteinu je spojená s virulencí patogenních mikroorganismů, díky schopnosti napadat hostitelské epitelální buňky. Zároveň se předpokládá, že přítomnost fibronektinu může zvyšovat schopnost adherence probiotických bakterií k hostitelským buňkám ve prospěch vyloučení patogenů (Lehri et al. 2015; Hymes et al. 2016). Na druhé straně stojí proteiny povrchové vrstvy, extracelulární para-krystalické proteiny, které pokrývají buněčný povrch bakterií a mají různé funkce, například jako



promotory adheze, antifoulingový povlak a strukturní složky (Sleytr et al. 2014). Distribuce a typy proteinů povrchové vrstvy se u jednotlivých bakteriálních kmenů liší. Předpokládá se, že jsou nezbytné pro adhezi probiotických bakterií na střevní buňky, protože při chemickém odstranění těchto proteinů došlo k výraznému poklesu schopnosti adherovat (Zhang et al. 2013).

Adherence probiotických bakterií je běžně hodnocena pomocí *in vitro* experimentů, kdy se užívá mucin adsorbovaný na abiotické povrchy a lidské tumorigenní buněčné linie, jako jsou Caco-2 a HT-29, k napodobení adheze k buňkám střevního epitelu. (Lebeer et al. 2012; Monteagudo-Mera et al. 2012; Tuo et al. 2013; Garriga et al. 2015). Použití epitelových buněčných linií je mimořádně užitečné pro identifikaci adhezivního mechanismu a molekul. Wand a kolegové (Wang et al. 2017b) nedávno pomocí buněčných linií HT-29 identifikovali nový protein povrchové vrstvy, protein vázající cholin A, nezbytný pro adhezi nového probiotického kmene *Lactobacillus salivarius* REN. Identifikace adhezivních molekul a jejich genů, by mohla být užitečná pro tvorbu vektorů zvyšujících adhezivní schopnost jiných probiotických kmenů (Zhang et al. 2015).

Přestože jsou *in vitro* experimenty klíčem k pochopení mechanismů adheze a výběru probiotických kandidátů s potenciálem adherovat v *in vivo* podmínkách, je obtížné extrapolovat tyto výsledky na lidský gastrointestinální trakt. *In vitro* experimenty zanedbávají řadu faktorů, jako jsou peristaltické pohyby, imunitní systém hostitele, nebo kompetice mezi rezidentní mikrobiotou (Park et al. 2015). Při *in vivo* studiích se probiotické kmeny obvykle určují ve vzorcích stolice, díky neinvazivnosti této metody (Mai et al. 2017). Ačkoliv výtěžek probiotických bakterií z fekálií je známkou odolání drsným podmínkám lidského gastrointestinálního traktu, neukazuje nám celkový počet bakterií adherovaných na střevní sliznici. V tomto ohledu by studie s invazivnějšími protokoly (například biopsie) mohly osvětlit základní mechanismy adherence probiotik v tlustém střevě. Zmora et al. (Zmora et al. 2018) provedla lidskou studii na skupině zdravých dobrovolníků, kdy dobrovolníci dostávali po dobu 4 týdnů probiotický přípravek dvakrát denně. Nakonec byly posbírány vzorky stolice a dobrovolníkům byla provedena hloubková endoskopie a kolonoskopie z důvodu odběru vzorků přímo z horního a dolního gastrointestinálního traktu. Autoři zjistili, že schopnost kolonizovat a adherovat na buňky střevního epitelu je u různých jedinců rozdílná. Tento fakt potvrzuje tvrzení, že rezidentní mikrobiota má velký vliv na adherenci probiotických bakterií a že vývoj *in vitro* modelů s normální mikrobiotou by mohl poskytnout realističtější možnost pro posouzení adhezních vlastností a mechanismů probiotických kmenů. Ačkoliv zvířata bez choroboplodných zárodků a genobiotika jsou dobrou alternativou pro studium probiotického působení ve střevě, genetika hostitele a translace na člověka je stále omezena. Nové technologické modely typu „*gut-on-a-chip*“, by mohly nabídnout nové možnosti ve studiu mechanismů adherence *in vitro* v ekosystému mikrobioty s různými populacemi lidských střevních buněk a peristaltickými pohyby (Jalili-Firoozinezhad et al. 2019).

### 3.4 Lepek

Pšenice patří mezi nejvíce konzumované potraviny ve velké části světa a prostřednictvím výrobků z ní, ovlivňuje také střevní mikrobiotu (Biesiekierski 2017). Pšeničný lepek byl jedním z prvních proteinů, které byly studovány. Je velmi intenzivně studován nejen díky svým vlastnostem v pečivárenství, ale zároveň ve vztahu k onemocněním člověka. Lepek je běžně

definován, jako bílkovinná hmota, která setrvává, když je těsto vyrobeno z pšeničné mouky a jemně promýváno přebytkem vody nebo zředěného solného roztoku, aby se odstranil škrob a rozpustný materiál (Shewry 2019). Zbývající materiál obsahuje 75–80 % bílkovin na bázi sušiny, v závislosti na tom, jak dobře se materiál promyl. Z tohoto důvodu jsou lepkové bílkoviny definovány jako ty, které jsou obsaženy v této hmotě, a protože podobný materiál nemůže být izolován z těst vyrobených z mouk jiných obilovin, lepkové bílkoviny jsou tak omezeny na pšeničné zrno (druh rodu *Triticum*). V ostatních obilovinách jsou však podobné proteiny, které bývají často označovány stejně jako lepek. Obecně jsou lepek a příbuzné proteiny označovány jako prolaminy, přičemž u pšenice jsou nejvíce zastoupeny gliadinem a gluteninem (Tosi 2012; Shewry 2019).

Na základě Osbornovi frakcionace (extrakce v řadě rozpouštědel) byly rozpoznány čtyři frakce: albuminy (rozpustné ve vodě), globuliny (rozpustné ve zředěném fyziologickém roztoku), prolaminy (rozpustné v 60–70% alkoholu) a gluteliny (nerozpustné v rozpouštědlech, ale extrahovatelné zásadou). Albuminy a globuliny jsou snadno rozlišitelné. Prolaminy byly rozpoznány a definovány pouze u obilných zrn, přičemž jejich název je odvozen od vysokého podílu prolinových a amidových dusíků (nyní je však známo, že je odvozen od glutaminu). Tato frakce má specifický název u různých druhů obilovin, gliadin v pšenici, hordein v ječmeni, secalin v žitě a zein v kukuřici (Shewry 2019).

Lepkové proteiny jsou hlavní skupinou zásobních látek uložených v zrně, jejichž úkolem je podpora klíčení a vývoj sazenic. Důležitým bodem je, že lepkové proteiny nejsou rovnoměrně distribuovány v endospermových buňkách, ale jsou přítomné ve dvou až třech vrstvách sub-aleuronových buněk. Složení lepkových proteinů se liší směrem od sub-aleuronové vrstvy po centrální část. Zvyšuje se procento vysokomolekulárních lepkových podjednotek (označeno HMW – high molecular weight), klesá podíl nízko molekulárních podjednotek (označeno LMW – low molecular weight) a zároveň klesá podíl gliadinů (kromě  $\omega$ -gliadinů). Tyto přechody ve složení se částečně odrážejí v obsahu a složení lepkových proteinů v produktech z mouky produkovaných komerčním válcovým mletím, což naznačuje, že všechny tyto frakce se mohou lišit ve svém dopadu na lidské zdraví (He et al. 2013; Tosi et al. 2018).

Frakce lepkových proteinů obsahuje komplexní směs složek, kterou lze rozdělit do skupin pomocí elektroforézy. Elektroforézou gliadinů při nízkém pH získáme čtyři skupiny pásů, které se nazývají (z hlediska snížení mobility)  $\alpha$ -gliadiny,  $\beta$ -gliadiny,  $\gamma$ -gliadiny a  $\omega$ -gliadiny. Pomocí srovnání aminokyselinových sekvencí bylo zjištěno, že  $\alpha$ - a  $\beta$ -gliadiny tvoří jednu skupinu, obvykle nazývanou jako gliadiny typu  $\alpha$  (Shewry 2019).

Gluteninové polymery jsou příliš velké na to, aby se daly oddělit běžnou elektroforézou, a proto se užívá redukce meziřetězcových disulfidických vazeb, které jsou zodpovědné za stabilizaci polymeru. Díky této redukci je možné rozdělit následně podjednotky elektroforézou na polykarylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným. Získáme tak dva pásy podjednotek zvaných HMW a LMW. Poslední skupina se dá rozdělit na podjednotky LMW typu B a dvě menší skupiny LMW typu C a D (Bromilow et al. 2017; Shewry 2019).

Porovnání aminokyselinových sekvencí těchto skupin složek lepkového proteinu objasňuje jejich vztahy a ukazuje, že podjednotky HMW a  $\omega$ -gliadiny tvoří samostatné skupiny, přičemž podskupiny  $\alpha$ -gliadinů,  $\gamma$ -gliadinů a B-typ LMW tvoří třetí skupinu. Menší skupiny podjednotek LMW typu C a D se zdají být modifikovanými formami gliadinů, ve kterých

mutace za vzniku cysteinových zbytků umožňují jejich plné zabudování do gluteninových polymerů, přičemž podjednotky LMW typu C jsou modifikované  $\alpha$ -gliadiny nebo  $\lambda$ -gliadiny a modifikované  $\omega$ -gliadiny typu D. Tato klasifikace zůstává platná navzdory obrovskému nárůstu znalostí sekvence lepkových proteinů během posledních pár let (Bromilow et al. 2017; Shewry 2019). Odstranění nadbytečných, částečných a nesprávně přiřazených sekvencí umožnilo sestavení databáze o 630 sekvencích.

Ačkoliv bylo získáno přes 600 sekvencí lepkových proteinů, neznamená to, že jednotlivé genotypy pšenice obsahují tento počet proteinů. Přesný počet lepkových proteinů přítomných ve zralém semeni pšenice nebyl stanoven, ale zkoumání dvourozměrných elektroforetických separací naznačuje, že počet lepkových proteinů přítomných v detekovatelném množství se pohybuje v rozmezí 50 a 100. Tuto tezi potvrdil svými studiemi (Bromilow et al. 2016), který identifikoval 63 lepkových proteinů v jediném kultivaru pšenice pomocí hmotnostní spektrometrie (Bromilow et al. 2017).

I přes to, že výše diskutované prolaminové skupiny představují převážnou většinu lepkových proteinů, práce z posledních let naznačují, že jsou zde přítomna i malá množství dalšího typu lepkového proteinu. Tento typ byl definován jako  $\delta$ -gliadin a srovnání jeho aminokyselinových sekvencí naznačuje, že tvoří část širší rodiny  $\gamma$ -prolaminů (v pořadí jsou pak nejbližší k sekvencím  $\gamma$ 3-hordeinům ječmene) (Huo et al. 2018; Altenbach et al. 2020).

### 3.4.1 Vlastnosti lepku

Nejdůležitější charakteristikou proteinů pšeničného lepku ve vztahu k jejich roli při celiakii je přítomnost bílkovinných domén obsahujících opakující se sekvence. Domény se liší v rozsahu, ale obecně tvoří 30 až 50 % bílkovinné sekvence v gliadinových LMW podjednotkách bohatých na síru. Dále tvoří 75 až 85 % v HMW podjednotkách a téměř 100% v  $\omega$ -gliadinech (Shewry 2009). Zahrnují tandemové opakování krátkých peptidů obsahujících tři až devět aminokyselinových zbytků.

Nejčastěji studované opakující se sekvence jsou přítomné u HMW podjednotek gluteninu. Tyto opakující se sekvence bývají založené na třech motivech, na hexapeptidu PGQGQQ, nonapeptidu GYYPTSPQQ nebo GYYPTSLQQ a u podjednotek typu x na tripeptidu GQQ (P – prolin, G – glycin, Q – glutamin, Y – tyrosin, T – threonin, S – serin, L – leucin). Motivy přítomné v ostatních skupinách lepkových proteinů jsou obecně méně dobře konzervované a identifikace shodných motivů je subjektivnější než v podjednotkách HMW. Všechny jsou však bohaté na prolin a glutamin, například PQQPFPQQ (F – fenylalanin) v  $\gamma$ -gliadinech. Je třeba dodat, že tyto sekvence jsou zodpovědné za charakteristické složení aminokyselin celých proteinů, zejména vysoký obsah glutaminu (35–55 mol%) a prolinu (10–25 mol%) ve všech skupinách prolaminů. Vysoký obsah glycinu u HMW podjednotek (11–12 mol%) a fenylalaninu (kolem 11 mol%) u  $\omega$ -gliadinů (Shewry 2019).

Všechny tyto opakující se sekvence mohou být zodpovědné za neobvyklé vlastnosti rozpustnosti lepkových proteinů. Přestože je glutamin hydrofilní aminokyselinou, pravidelně se opakující zbytky glutaminu u lepkových proteinů se považují za tvůrce vodíkové vazby protein – protein, která má za následek nerozpustnost ve vodě (Belton 1999). Opakující se sekvence hrají také klíčovou roli při spouštění celiakie. Všech 31 „epitopů T-buněk souvisejících s celiakií“ je přítomno v opakujících se doménách pšenice a příbuzných obilovin (jako jsou ječmen, oves a žito) a všechny skupiny lepkových proteinů (gliadiny a gluteniny)

obsahují tyto epitopy. Nicméně některé jednotlivé proteiny v rámci těchto skupin nemusí být rozpoznány těmito celiakálními epitopy (v současnosti se seznam epitopů považuje za nekompletní) (Sollid et al. 2012; Gilissen et al. 2014; Shewry & Tatham 2016; Juhasz et al. 2018).

Ke globálnímu úspěchu pšenice přispělo hned několik faktorů. Jedním z těchto faktorů je široká přizpůsobivost. Hlavním důvodem, proč se v mnoha zemích pěstuje přednostně na úkor jiných obilovin, jsou funkční vlastnosti právě pšeničné mouky. Pšenice je jediná obilovina, kterou lze upéct a získat kynutý chléb, další pečené výrobky, těstoviny a nudle. Kvalita těchto výrobků je do značné míry udávána proteiny lepku, které utváří v těstě souvislou síť. Díky této síti jsou výrobky soudržné (vhodné pro těstoviny) a také viskoelastické (důležité pro výrobu chleba). Navzdory rozsáhlé literatuře pojednávající na toto téma, stále není molekulární základ pro biofyzikální vlastnosti lepku objasněn. Můžeme však diskutovat o dvou důležitých bodech. Za prvé, vlastnosti závisí na účasti jak gliadinů, tak gluteninů, přičemž gluteninové podjednotky vytvářejí velké trojrozměrné sítě stabilizované meziřetězcovými disulfidickými vazbami, které interagují s gliadiny a ostatními gluteninovými sítěmi pomocí nekovalentních sil, potažmo pomocí vodíkových vazeb. Zadruhé zde působí kombinace sil, která stabilizuje polymery. Význam disulfidických vazeb byl snadno prokázán, protože je můžeme pomocí redukčních činidel narušit a toto narušení následně vede ke katastrofálnímu efektu na funkčnosti. (Belton 1999) navrhl a prokázal, že vodíkové vazby jsou zvláště důležité při vývoji optimálních interakcí proteinů během míchání těsta (Shewry 2019).

Lepek je tráven na peptidy v tenkém střevě, ale vzhledem k charakteristice lidských žaludečních a pankreatických peptidáz zůstává relativně velký zbytkový peptid bohatý na prolin a glutamin v lumenu střeva. Přibližně pro 99 % zdravých jedinců a jedinců trpících celiakií avšak nesoucích alely citlivosti HLA-DQ2 a HLA-DQ8, to není žádný problém (Kagnoff 2007). U běžných pacientů s celiakií však tyto částečně štěpené peptidy dosáhnou do subepiteliální oblasti mukózy tenkého střeva. Mechanismus, díky kterému k tomuto dochází, zatím není zcela pochopen (Bascunan et al. 2017).

### 3.4.2 Účinky lepku

Jakmile části lepku dosáhnou lamia propria ve sliznici střeva, jsou glutaminové zbytky v peptidu gliadinu deaminovány na kyselinu glutamovou pomocí tkáňové transglutaminázy 2 (tTG2), což je jev, který vede ke komplexu s vysokou afinitou k DQ2 nebo DQ8 kapsám přítomným v buňkách s patričním antigenem. Uvolňování prozánětlivých cytokinů, jako je například interferon- $\gamma$ , udržuje zánětlivé procesy, které vedou k funkčnímu poškození sliznice, včetně porušení střevní propustnosti (Daum et al. 1999). Během těchto procesů je aktivace a uvolnění metaloproteináz zodpovědná za typické architektonické změny se zploštěním klků, zvýšením intraepiteliálních lymfocytů, hypertrofií krypt a zvýšenou buněčností (zejména lymfocytů a plazmacytů) v lamia propria (Spaenij–Dekking et al. 2005). Ukázalo se, že některé inhibitory  $\alpha$ -amyláz a tripsinu (ATI) z pšenice jsou silnými aktivátory vrozených imunitních odpovědí v monocytech, makrofázích a dendritických buňkách celiaků i zdravých jedinců, což naznačuje, že cereální ATI mohou také přispívat k patogenezi celiakie (Junker et al. 2012).

### 3.4.3 Tolerance lepku

Řada studií zkoumala množství lepku tolerovaného pacienty, aniž by došlo ke změnám na sliznici tenkého střeva nebo k vyvolání jiných klinických příznaků. Nedostatek zvířecích modelů ztěžuje posouzení tohoto problému a studie prováděné na pacientech, kteří podstoupili provokaci lepkem, trvají pouze po krátkou dobu. Proto neexistuje žádná jistota ani absolutní odpověď. Rozdílné výsledky získané v různých studiích jsou způsobeny vysoce variabilní citlivostí na lepek pozorovanou u pacientů trpících celiakií (Hischenhuber et al. 2006).

Posouzení zdravotních rizik po expozici lepku provedené americkým úřadem FDA v roce 2011 analyzovalo dostupné důkazy získané buď klinickými nebo histologickými ukazateli. Po vyhodnocení všech dostupných údajů o odezvě na nízké dávky a jejich nepříznivému účinku na zdraví souvisejících s celiakií byla vypočítána tolerovatelná denní dávka lepku. Pro jedince trpící celiakií dávka 0,4 mg lepku za den pro nepříznivé morfoloické účinky a dávka 0,015 mg lepku za den pro nežádoucí klinické účinky. Autoři zdůraznili, že některé důkazy naznačují, že přijatelná dávka nemusí stačit k ochraně všech jedinců trpících celiakií (Bascunan et al. 2017).

V roce 2008 Codex Alimentarius stanovil, že mezní hodnota pro „bezpečkové“ výrobky je 20 ppm. Mnoho zemí nyní stanovilo své mezní hodnoty od 20 ppm ve Španělsku, Itálii, Velké Británii, Kanadě a USA, po 10 ppm v Argentině a 3 ppm v Austrálii, na Novém Zélandu a v Chile (2013; Bascunan et al. 2017).

### 3.4.4 Celiakie

Celiakie je komplexní imunitně zprostředkovaná lepek-senzitivní enteropatie s různě se měnícími klinickými projevy. Projevuje se u geneticky predisponovaných jedinců, kteří požívají lepek v různých množstvích. Předpokládá se, že celiakie postihuje 1% populace USA. Prevalence se drasticky zvyšuje z 1:133 u pacientů bez rizika, na 1:56 u symptomatických pacientů, na 1:39 u pacientů s druhým stupněm příbuznosti s diagnózou a na 1:22 u pacientů s prvním stupněm příbuznosti s diagnózou. Může to být spojeno s několika imunitně zprostředkovanými jevy, autoimunitními chorobami, dále komplikováno nedostatkem vitamínů a dalších stopových prvků, onemocněním kostí a malignitou. Chápání celiakie se za poslední dvě desetiletí rychle vyvinulo, což vedlo k zájmu o možnosti léčby. V poslední době došlo k popsání několika stavů, včetně intolerance na lepek, neceliakální citlivosti na lepek a seronegativní celiakii. Tyto stavy se liší od alergií nebo intolerancí na pšenici a pšeničné výrobky. Komplexní zpráva výživy po diagnóze je klíčem k trvalému zdraví pacientů s celiakií. Jsou navrženy různé jednoduché algoritmy péče, založené na komplexním multidisciplinárním přístupu. Jsou zkoumány refrakterní a nereagující celiakie v rámci bezpečkové diety, stejně tak i nové nedietní terapie (McAllister et al. 2019).

Neexistuje shoda ohledně používání termínů souvisejících s celiakií a poruchami spojenými s požitím lepku. Mezi další používané deskriptory celiakie patří sprue, celiakální sprue, intolerance lepku a lepek-senzitivní enteropatie. Jedna z prvních definic definovala celiakii jako trvalý stav nesnášenlivosti lepku se zploštěním sliznice, který vedl k bezpečkové dietě a následně k opětovnému zavedení lepku do stravy (Meeuwisse 1970). S růstem širšího spektra poruch spojených s lepkem, byl v roce 2013 výsledkem rozsáhlého úsilí publikován přehled literatury a definic. Například v Oslu tak vznikla přehledná definice jednotlivých různých onemocnění spojených s lepkem. Celiakie byla definována jako chronická imunitně

zprostředkovaná enteropatie tenkého střeva vyvolaná expozicí lepku u geneticky predisponovaných jedinců. Klasická celiakie znamená celiakii s příznaky malabsorpce. Neklasická celiakie se týká pacientů s celiakií, ale bez souvisejících příznaků malabsorpce. Symptomatická celiakie se vyznačuje klinicky zjevnými gastrointestinálními a/nebo extraintestinálními projevy, které lze přičíst konzumaci lepku. Dále byl definován výraz poruchy spojené s lepkem, kam patří všechny nemoci vyvolávané lepkem. Patří sem glutenová ataxie, dermatitis herpetiformis, celiakie jako taková a neceliakální citlivost na lepek (Ludvigsson et al. 2013).

Přísné vyloučení lepku z diety po celý život je v současné době jediná účinná a bezpečná léčba celiakie. I přes to, že je tato léčba velmi úspěšná, často přináší pacientům v rodinném, sociálním a pracovním kontextu značné obtíže a zhoršuje tak kvalitu jejich života. Poslední studie naznačují, že dodržování takto striktní diety, může ve výsledku vést až k výživovým nedostatkům (Bascunan et al. 2017). Bezlepková dieta je typicky založena na kombinaci potravin, které přirozeně neobsahují lepek, je u nich nepravděpodobná zkřížená kontaminace lepkem, a speciálních produktů označovaných jako „bez lepku“ (La Vieille et al. 2014). Přísná bezlepková dieta je zároveň používána při léčbě neceliakální citlivosti na lepek, či pšenici (Ludvigsson et al. 2013; Fasano et al. 2015). Patogeneze, prognóza a průběh neceliakální citlivosti na lepek či pšenici nejsou zatím zcela objasněny. Bylo však naznačeno, že se na rozvoji tohoto onemocnění mohou podílet i jiné proteiny než lepkové anebo sacharidové složky pšeničného zrna. Prozatím pro toto tvrzení neexistuje dostatek důkazů, aby mohl být jasně vysloven závěr (Lebwohl et al. 2015). Dnes se však objevuje další skupina lidí. Tito lidé vylučují lepek ze své stravy a považují tak bezlepkovou dietu za zdravější styl výživy (Dana et al. 2015). Zda je pro zdravého člověka dodržování bezlepkové diety přínosnější a zdravější, než normální strava, je stále nejasné a nepotvrzené (Bascunan et al. 2017).

### 3.4.5 Bezlepková dieta

Léčba pomocí bezlepkové diety by měla být zahájena až po plné diagnóze pomocí klinických údajů, serologie a histologie tenkého střeva (Hopper et al. 2007). V současné době se doporučuje, aby pacienti byli doporučeni k dietologovi, který má zkušenosti s celiakií. Dietolog pak pomůže navrhnout optimální stravovací plán, který je bezlepkový a zároveň nutričně přiměřený. Musí pacienta také edukovat o dodržování bezlepkových stravovacích návyků (Ludvigsson & Green 2011). Existuje poměrně dlouhý seznam obilovin, semen, luštěnin a ořechů, které mohou nahradit potraviny obsahující lepek (například amarant, quinoa, proso, čirok, len a cizrna), všechny mohou zlepšit chutnost a nutriční kvalitu bezlepkové diety. Avšak používají se jen zřídka, částečně kvůli jejich vyšším nákladům a menší dostupnosti (Kupper 2005). Místo toho bezlepkové výrobky obvykle obsahují krátký seznam přísad a nejsou obohaceny o mikroživiny jako jejich protějšky vyráběné z pšenice (do Nascimento et al. 2013). Z nových přístupů, které hledají zlepšení nutričních vlastností bezlepkových produktů, stojí za zmínku bezlepkové chleby s quinoou a lněným semínkem, které mají lepší rovnováhu polynenasycených a nasycených mastných kyselin a dodávají nízké hladiny dobře přijatelných trans-mastných kyselin (Minekus et al. 2014a). Quinoa a lněné semínko se rovněž doporučují ke zlepšení množství  $\omega 3$  mastných kyselin v bezlepkových výrobcích (Rahaie et al. 2014). Zpracované potraviny na bázi amarantu, quinoi a pohanky mají vyšší obsah bílkovin, tuků, vlákniny a minerálů a ve srovnání s potravinami vyrobené z rýže a kukuřice představují

velmi dobrou alternativu pro bezpečkové výrobky (Bascunan et al. 2017). Obrázek 3 ukazuje, že dodržování bezpečkové diety ovlivňuje řada faktorů, které je potřeba řešit během sledování a léčby pacienta. Na jedné straně dodržování správné stravy, na druhé klinický a nutriční dopad na průběh onemocnění, jeho komplikace a důsledky na kvalitu života pacienta.



**Obrázek 3:** Faktory ovlivňující bezpečkovou dietu a její dodržování. Vliv bezpečkové diety na pacienta. (Bascunan et al. 2017).

Dnes se nové techniky v potravinářské technologii zaměřují na vývoj intraluminálních terapií zaměřených na snížení imunogenicity lepku nebo hydrolyzování lepkových peptidů. Doposud byly snahy o genetickou modifikaci zrn s účelem snížení imunogenních složek neúspěšné. Trávení potravinového lepku bylo navrženo na základě podávání orálních endopeptidáz odvozených od rostlin, bakterií a hub, které mohou hydrolyzovat glutenové peptidy v trávicích traktu. Avšak množství zbytkového lepku a dosažená úroveň trávení zůstávají nejisté. Dalším zvažovaným přístupem je předběžná úprava kvásku proteázami z laktobacilů, které byly přidány při fermentaci. Předpokládá se, že fermentace bude dostatečná tak, aby se peptidy lepku hydrolyzovaly na netoxickou úroveň (Schuppan et al. 2009; Mukherjee et al. 2012).

Oves představuje pro většinu pacientů s celiakii bezpečnou variantu, obvykle ale bývá kontaminován lepem, a proto je v bezpečkové dietě omezován (Nasr et al. 2012). Dle (Lundin et al. 2003) se kontaminace v obchodním ovsu ve stejném balení pohybuje mezi 1,5 a 400 ppm. Pokud je však oves pěstován za zvláštních podmínek pěstování, sklizně a distribuce, může být celiaky bezpečně konzumován (Nasr et al. 2012). Spor přetrvává, co se týče pšeničného škrobu. V Evropě je pšeničný škrob používán v bezpečkových výrobcích čistěn tak, aby splňoval požadavky Codex Alimentarius, zatímco v USA není jeho použití akceptováno (Kupper 2005).

### 3.5 *In vitro* trávení

Trávicí procesy probíhají v horním gastrointestinálním traktu, který se skládá z dutiny ústní, jícnu, žaludku a dvanáctníku a významně ovlivňují postprandiální metabolismus a lidské zdraví (Miao et al. 2015; Raigond et al. 2015). Zkoumání lidského trávení by mělo být

prováděno ideálně v *in vivo* podmínkách, aby bylo dosaženo přesných a spolehlivých výsledků, avšak tyto klinické studie jsou velmi složité, protože jsou náročně z hlediska technologie, financí a nebyvají eticky realizovatelné. Zároveň je ohrožena opakovatelnost z důvodu značné individuální variability (Minekus et al. 2014a). Z těchto důvodů se v posledních dekadách zvyšuje zájem o získání spolehlivých výsledků pomocí *in vitro* modelu trávení, který dokáže úzce napodobit lidský gastrointestinální trakt. *In vitro* studie nepodléhá etickým restrikcím, její postupy jsou efektivnější, levnější a přímočaré (Chen et al. 2011). I přes tyto výhody je design a vytvoření ideálního *in vitro* trávicího systému, který je plně schopen nasimulovat co se děje během *in vivo* trávení v lidském gastrointestinálním traktu velmi složité a výzvou. Je to dáno tím, že *in vivo* trávení zahrnuje složitou mobilitu gastrointestinálního traktu, anatomické struktury, nespočet enzymů a hormonů spojených s trávením, které jsou kritické pro správné trávení. *In vitro* trávicí model se proto vyvíjí a podléhá novým technologickým vylepšením za cílem zvýšení relevantnosti ke skutečnému trávení v *in vivo* podmínkách (Li et al. 2020b).

V posledních letech je užíváno několik modelů simulujících *in vitro* trávení, od jednoduchých statických modelů, až po složité multisložkové dynamické systémy. Většina současných a předešlých pokusů o porozumění chování trávení užívá statické nástroje, jako pH-stat, vodní třepací lázně a rotační vzduchové lázně. Tyto statické modely simulují žaludek a/nebo tenké střevo užitím sledu míchacích nádob a vytváří tak jednu sadu biologických podmínek (tj. teplota, enzymy, pH a žlučové soli) v různých oddílech gastrointestinálního traktu. Hlavní zájem u *in vitro* statických protokolů je značná variabilita v použití různých trávicích parametrů mezi jednotlivými individuálními modely. Parametry obvykle zahrnují pH, trvání jednotlivých kroků trávení, množství a druh použitých trávicích enzymů, rychlost procesů a množství vzorku potravy. Tyto variace brání možnosti porovnávat výsledky mezi různými výzkumnými skupinami a vyvodit obecná zjištění (Guerra et al. 2012; Minekus et al. 2014a; Barros et al. 2016).

Například populární statický model trávení zavedený (Englyst et al. 1992) zahrnoval orální a gastrickou fázi. Pro napodobení žvýkání používal mlýnek, polypropylenová centrifugační trubička umístěná v rotačním kole při 37 °C simuluje rytmické peristaltické kontrakce a smíchání sousta s látkami uvnitř horního gastrointestinálního traktu člověka. Postupně byly použity roztoky slinné  $\alpha$ -amylázy, pepsinu a pankreatinu jako trávicí enzymy odpovídající enzymům orální, gastrické a střevní fáze. Alikvoty vzorků lze odebrat v různých inkubačních dobách pro výsledný test trávené mikroživiny. Kvůli přílišnému zjednodušení, kdy jsou zanedbány mechanické síly, různé proudění kapalin a fyziologie trávení jsou statické modely *in vitro* trávení používány převážně pro mechanistické studie a vytváření hypotéz s konkrétními aplikacemi pro účely screeningu (Li et al. 2020b).

Díky těmto důvodům se přešlo k vývoji více sofistikovaných dynamických *in vitro* modelů od jednoduchých, až po multi-kompartimentové systémy. V porovnání se statickými modely, jsou ty dynamické schopny simulovat dynamické aspekty trávení jako například přesun tráveniny, postupné uvolňování trávicích látek, různou koncentraci enzymů a změny pH napříč trávicím traktem jako v případě *in vivo* podmínek (Minekus et al. 2014a; Shani-Levi et al. 2017). Mezi v současnosti používané dynamické modely *in vitro* trávení patří SHIME (Simulator of the human intestinal microbial ecosystem), TIM (TNO's gastrointestinal model), DGM (Dynamic gastric model), HGS (Human gastric simulator), GDS (Gastric digestion



simulator), IMGS (*In vitro* mechanical gastric system), DRSD (Dynamic rat stomach duodenum system) a DHSI (Dynamic human stomach-intestine ecosystem) (Li et al. 2020b).

Za posledních několik let *in vitro* systémy značně zvyšují svoji atraktivnost a rozšiřují své působení pro studie v oboru výživy a farmacie. Vděčí za to svým výhodám, jako jsou rychlost, lepší opakovatelnost, nižší ceny, menší nároky na práci a žádné etické restrikce, které jsou u *in vivo* studií lidského trávení přítomné. Navzdory svým výhodám, se *in vitro* systémy trávení musí dále zdokonalovat a vyvíjet, aby se dosáhlo oddálení jejich limitů. Například žádný *in vitro* systém trávení zatím není schopen simulovat celé trávení od dutiny ústní po tlusté střevo a zároveň stále není možné simulovat všechny vlivy ovlivňující trávení jedince, jako například věk, pohlaví a nemoci. Tyto *in vitro* trávicí systémy tak musí do budoucna podléhat neustálému technologickému vývoji, aby se co nejvěrněji přiblížily reálné situaci při *in vivo* trávení (Marze 2017; Li et al. 2020b).

## 4 Materiál a metodika

### 4.1 Materiál

Buněčná kultura Caco-2 a HT29 získaná z American Type Tissue Collection (Rockville, Maryland, USA), fosfátový pufr (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline DPBS), Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM/F12 – doplněno 10% FBS, 1% hydrogenuhličitanem sodným, 1% pyruvátém sodným, 1% neesenciálními aminokyselinami a 1% penicilinem a streptomycinem), fetální bovinní sérum (FBS), neesenciální aminokyseliny, penicilin, streptomycin, dimethylsulfoxid (DMSO) a Triton-X100 od Sigma-Aldrich (USA). Pšeničná bílkovina jedlá vitální (lepek) od VEGA PROVITA, s.r.o. Reader infinite M200 (Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria), vodní třepací lázeň (Huber Kältemnasaschinenbau AG, DE), termostat (JEIO TECH), centrifuga Universal 320 (Hettich), laboratorní míchačka Vortex (IKA®, DE), CO<sub>2</sub> inkubátor (Panasonoc), kultivační láhve, serologické pipety, pH metr, mrazicí zařízení schopné dosáhnout teploty - 80 °C, digestoř, laboratorní nádobí, Tecan Infinity M200 (Tecan, Swizerland). Tabulka 3 shrnuje použité roztoky.

**Tabulka 3:** Seznam použitých roztoků.

Roztok	Zkratka
Fetální bovinní sérum	FBS
Médium pro kultivaci buněk	DMEM
Fosfátový pufr	PBS (DPBS)
Dimethylsulfoxid	DMSO
Intová povrchově aktivní látka	Triton-X100
Simulovaná slinná tekutina	SSF
Simulovaná žaludeční tekutina	SGF
Simulovaná střevní tekutina	SIF

### 4.2 Metodika

#### 4.2.1 Příprava vzorků

Čistý lepek byl rozdělen na dvě části. První část byla ponechána beze změny a byla dávkována do simulovaného trávicího procesu. Druhá část byla rozmíchána s vodou v poměru 1:2 a následně pečena v horkovzdušné troubě na 180 °C po dobu 50 minut. Po upečení lepek vytvořil pevné kulaté bochničky, které bylo nutné namlít do formy strouhanky. Vzorky pšeničného pečiva, rohlík a bageta, byly nadrceny na jemnou strouhanku, stejně tak chléb Šumava. Po homogenizaci všech vzorků se zahájil simulovaný trávicí proces.

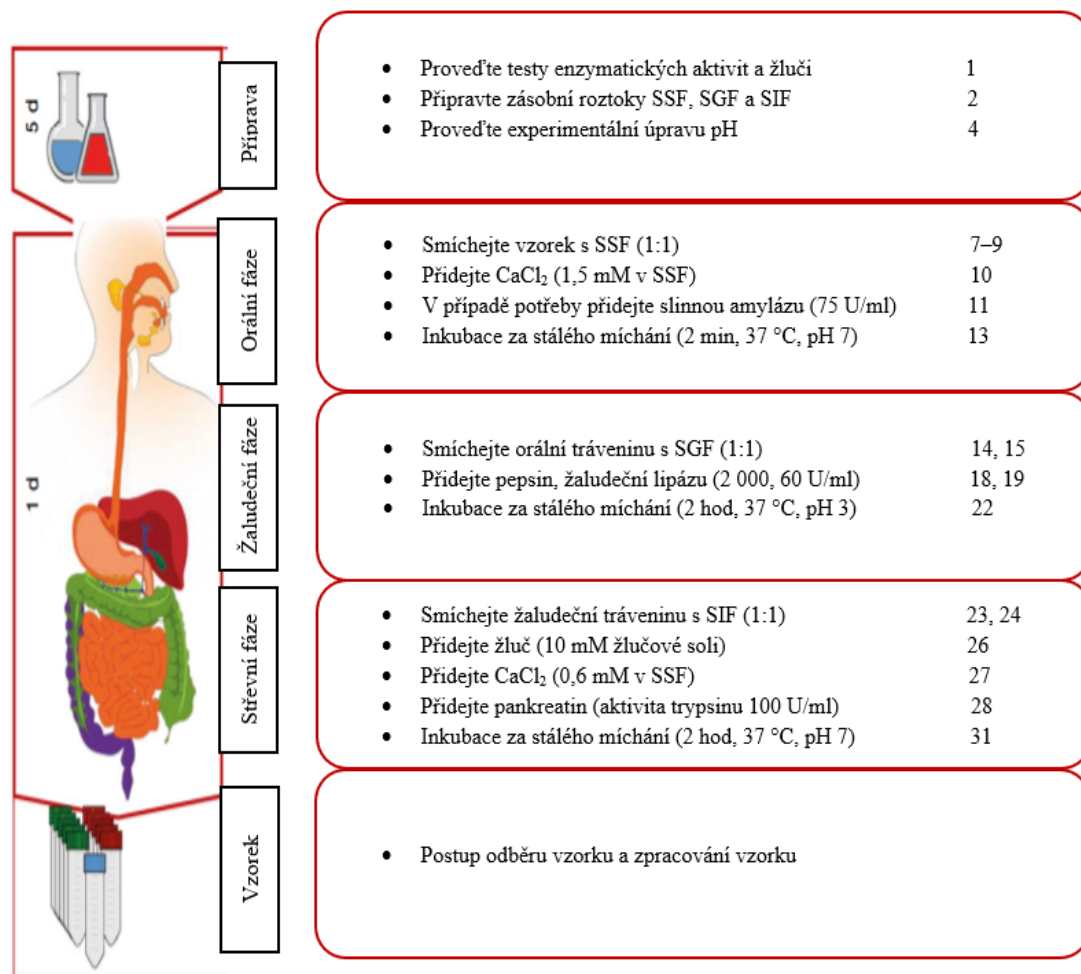
#### 4.2.2 *In vitro* střevní model

Byl použit *in vitro* střevní model dle (Brodkorb et al. 2019), který simuluje trávicí fázi od dutiny ústní, až po příslušnou střevní fázi. Obrázek 4 znázorňuje jednotlivé kroky simulovaného trávení. Nejprve byly připraveny roztoky a trávicí tekutiny a otestována aktivita enzymů. Následně došlo k úpravě vzorků, které byly po namletí dávkovány po 5 g do 50 ml zkumavek, ve kterých poté probíhalo celé trávení. V prvním kroku se simulovala orální fáze, kdy byl dávkován chlorid vápenatý, voda, amyláza a zásobní roztok SSF. Vzorky se následně umístily do třepací vodní lázně na dobu 2 minut. Ve druhém kroku se přešlo do fáze žaludeční. Do zkumavek byl přidán pepsin (ve formě pepsinogenu), kyselina chlorovodíková, chlorid

vápenatý, voda a zásobní roztok SGF. Při žaludeční fázi se pomocí pH metru hlídalo celkové pH vzorků s roztoky, které muselo být stabilně tři. Po kontrole a vyrovnání pH byly zkumavky umístěny zpět do vodní třepací lázně na další 2 hodiny. Poslední a třetí fází je fáze střevní. Do zkumavek byly přidány: kyselina chlorovodíková, pankreatin, žluč, chlorid vápenatý, voda a zásobní roztok SIF. Při této fázi bylo nutno vyrovnat a udržet pH na úrovni sedm. Po dokončení vyrovnávání pH a dávkování roztoků, byly zkumavky umístěny zpět do vodní třepací lázně na další 2 hodiny. Po celou dobu bylo od začátku žaludeční fáze pravidelně v intervalech 30 minut kontrolováno pH tak, aby odpovídalo třem anebo sedmi, dle příslušné trávicí fáze, ve které se trávenina nacházela. Tabulka 4 ukazuje složení trávicích tekutin. Po ukončení trávení byly vzorky umístěny do mrazícího boxu a zchlazeny na teplotu – 80 °C, aby došlo k inhibici trávicích enzymů a zastavení procesu trávení. Vzorky zůstaly uloženy po dobu nezbytně dlouho pro přípravu tkání v dalším kroku experimentu.

**Tabulka 4:** Složení trávicích tekutin.

<b>Chemikálie</b>	<b>Koncentrace</b>	<b>SSF</b>	<b>SGF</b>	<b>SIF</b>
Chlorid draselný	0,5 M	15,1 ml	6,9 ml	6,8 ml
Dihydrogenfosforečnan vápenatý	0,5 M	3,7 ml	0,9 ml	0,8 ml
Hydrogenuhlíčitan sodný	1 M	6,8 ml	12,5 ml	42,5 ml
Chlorid sodný	2 M	-	11,8 ml	9,6 ml
Hexahydrát chloridu hořečnatého	0,15 M	0,5 ml	0,4 ml	1,1 ml
Uhlíčitan amonný	0,5 M	0,06 ml	0,5 ml	-
Kyselina chlorovodíková	6 M	0,09 ml	1,3 ml	0,7 ml
Dihydrát chloridu vápenatého	0,3 M	0,025ml	0,005 ml	0,04 ml



**Obrázek 4:** Grafické znázornění jednotlivých fází *in vitro* simulace trávení. Upraveno dle (Brodkorb et al. 2019). Obrázek ukazuje zjednodušené schéma jednotlivých fází a aplikace chemikálií v příslušné trávicí fázi.

### 4.2.3 Kultivace buněčných linií

Pro testování byla použita buněčná linie kolorektálního karcinomu Caco-2 (ATCC; HTB-37). Tato linie byla kultivována v DMEM s 10% FBS, 1% hydrogenuhličitanu sodného, 1% pyruvátu sodného, 1% neesenciálních aminokyselin, 1% penicilinu a streptomycinu.

Buněčná linie byla kultivována v kultivačních lahvích přibližně 7 dní, během nichž docházelo k výměně média za čerstvé. Po 6 dnech, kdy bylo dosaženo 90% konfluency, byla buněčná vrstva promyta pomocí PBS. Po odstranění PBS bylo přidáno 5 ml trypsinu na dobu 3 minut. Po této době bylo k suspenzi přidáno 5 ml média. Celý tento obsah byl převeden do centrifugační zkumavky a točen po dobu 10 minut při 150× g. Neutralizovaný trypsin byl následně odstraněn a nahrazen čerstvým médiem, ve kterém byly buňky rozředěny. Buněčná suspenze v poměru 1:10 byla přidána do nové kultivační lahve s čerstvým médiem a umístěna do CO<sub>2</sub> kultivačního boxu s teplotou 37 °C. Zbytek buněčné linie byl následně naředěn na požadované koncentrace pro založení 96 jamkových destiček.

### 4.2.4 Založení 96 jamkové destičky

Z důkladně rozpuštěné buněčné suspenze bylo odebráno 100 µl a smícháno se 100 µl tropanové modři. Následně byla odebrána kapka a dána na Bürkeovu komůrku, kde byl v 1ml

suspenze vypočítán obsah buněk. Na základě výpočtu byla zjištěna koncentrace sklizených buněk. Buněčné linie byly naředěny na koncentraci  $2,5 \times 10^5$ , kultury Caco-2. Takto naředěná buněčná suspenze byla pipetována v množství 500  $\mu\text{l}$  do 96 jamkové destičky a umístěna do  $\text{CO}_2$  inkubátoru. Destička byla inkubována po dobu 14 dní a každý třetí den kontrolována a krmena. Po 14 dnech došlo k plné diferenciaci buněk.

#### 4.2.5 Příprava laktobacilů

Pěstování bakterií proběhlo přes noc za anaerobních podmínek při 37 °C. Poté bylo odebráno 5 ml z narostlé kultury laktobacilů do zkumavky. Zkumavka s laktobacily byla 3 $\times$  zcentrifugována při 1000 $\times$  a pokaždé promyta v PBS. Následně byly laktobacily znovu rozmíchány v 5 ml stejného pufru. Výsledná suspenze bakterií obsahovala  $10^6$  až  $10^7$  buněk v 1 ml a takto připravená suspenze byla následně barvena pomocí fluorescein isothiokyanátu rozpuštěného v 2,5 ml sodium bikarbonátu. Z důvodů řádného rozpuštění barviva byly 15 ml zkumavky obsahující 312,5  $\mu\text{l}$  barviva a 5 ml laktobacilů vloženy do vodní lázně s ultrazvukem. Po obarvení všech laktobacilů byl odlit vytvořený supernatant a zkumavky 2 $\times$  promyty pomocí PBS.

#### 4.2.6 Adherence

Testování adherence bylo dle metodiky (Jensen et al. 2012) s modifikacemi. Byla vytvořena kultura z Caco-2 buněčné linie. V koncentraci  $1 \times 10^6$  byla pipetována v objemu 100  $\mu\text{l}$  do 96 jamkové mikrotitrační destičky. Takto připravená destička byla následně kultivována 48 h v temnu v  $\text{CO}_2$  inkubátoru. Po kultivaci bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  nového média obsahujícího 20  $\mu\text{l}$  obarvených laktobacilů čtyřech testovaných kmenů a následně bylo aplikováno 80  $\mu\text{l}$  tráveniny obsahující lepek. Takto byly vytvořeny 4 destičky. Po fázi adherence byly buňky promyty PBS a vloženy do fluorescenční čtečky Tecan infinity M200 a poté sledovány pod mikroskopem. Získané výsledné hodnoty byly přepočítány na % adherence užitím následujícího vzorce:

$$X (\%) = (X_{\text{RFU}} - \text{NK}) \div (\text{PK} - \text{NK})$$

Kde X (%) je procento fluorescence v jamce;  $X_{\text{RFU}}$  je fluorescence jamky v relativních fluorescenčních jednotkách; NK je negativní kontrola (nespecifická fluorescence jamky); PK je pozitivní kontrola (bakteriální fluorescence bez promytí).

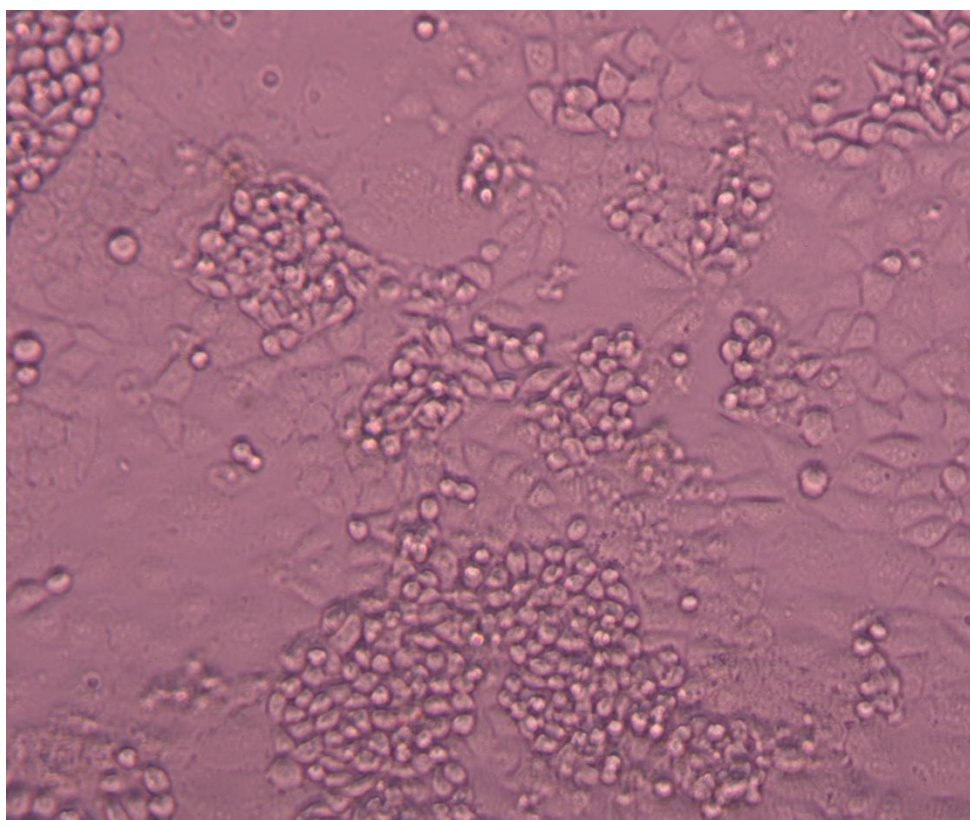
#### 4.2.7 Statistické vyhodnocení

Získané výsledky jsou vyjádřeny jako průměr a  $\pm$  odchylka. Výsledná data adherence jsou zpracována programem Excel pomocí oboustranného dvouvýběrového nepárového t-testu a pomocí analýzy rozptylu ANOVA v programu Statistica 12 s hladinou významnosti  $\alpha = 0,05$ .

## 5 Výsledky

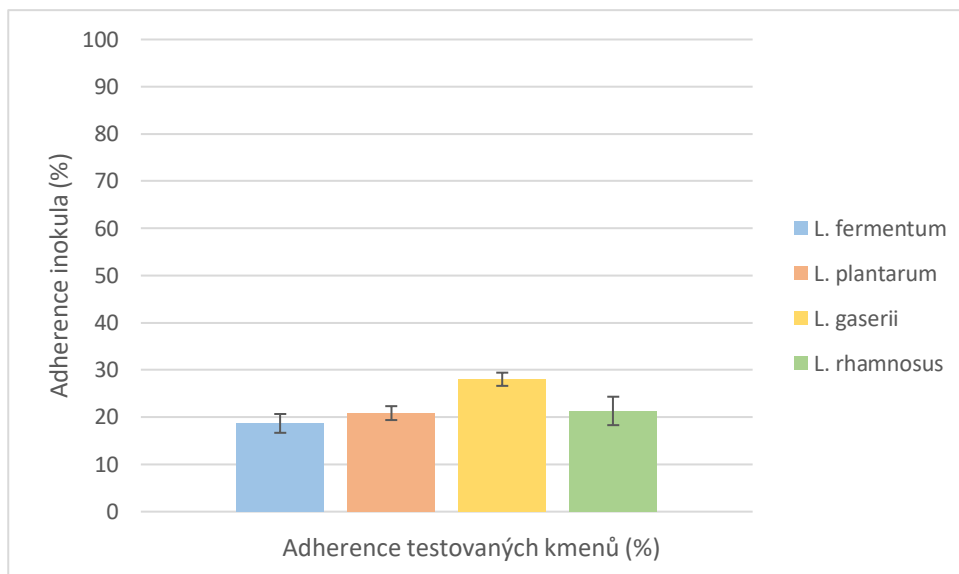
Cílem práce bylo zjistit schopnost stráveného lepku z různých potravinových zdrojů ovlivňovat schopnost laktobacilů adherovat na buněčný model střeva. Jako zdroje lepku bylo použito běžné pečivo, které většina lidí konzumuje denně, a čistý lepek. Vybrali jsme pšeničnou bagetu, rohlík tukový a chléb Šumava jakožto nejčastěji konzumované druhy běžného pečiva. Lepek byl testován ve formě čistého po tepelné úpravě a samostatný čistý lepek bez jakékoliv úpravy. Adherence byla testována u kmenů *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus gaserii* a *Lactobacillus rhamnosus*. Práce měla dále za cíl otestovat novou metodiku a navázat na výsledky bakalářské práce, kdy bylo zjištěno, že lepek má vliv na adherenci probiotických mikroorganismů *L. brevis* a *L. plantarum*.

V rámci této práce byla zavedena nová metodika využívající fluorescenční barvivo pro stanovení adherovaných bakterií na střevní model bez nutnosti jejich následné kultivace v petriho miskách na rogosovém agaru. Obrázek 5 ukazuje destičku s kultivovaným buněčným modelem Caco-2.



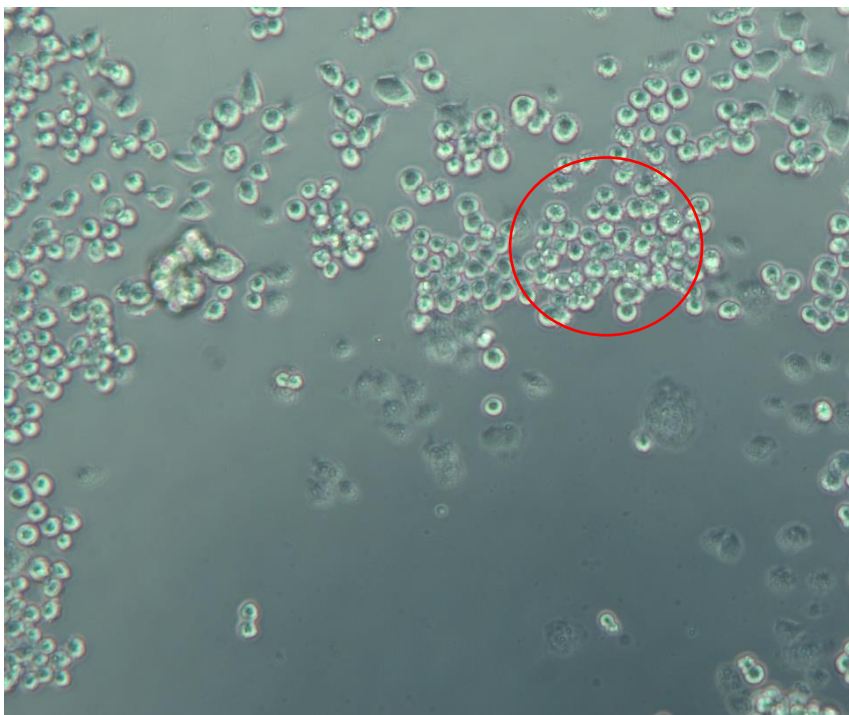
**Obrázek 5:** Samostatné buněčné linie bez aplikace tráveniny a laktobacilů bez promytí od média.  
Zvětšeno 1200×.

V rámci nové metodiky byla testována i samostatná schopnost testovaných kmenů adherovat na buněčný model. V průměru kmeny adherovaly okolo 20 %, kdy *L. fermentum* adherovalo průměrně z 18,69 %, *L. plantarum* z 20,87 %, *L. gaserii* z 28,04 % a *L. rhamnosus* z 21,33 % z použitého inokula.



**Obrázek 6:** Adherence laktobacilů k buněčným liniím před aplikací tráveniny.

Během následujícího testování adherence laktobacilů s tráveninou bylo zjištěno, že přestože vzorky prošly procesem *in vitro* trávení, tak se i nadále zejména s čistým lepem bez tepelné úpravy složitě manipulovalo, protože v trávenině tvořil nerozpustné shluky, které bránily pipetování. Po přidání laktobacilů a následné inkubaci, byla mikrotitrační destička nejprve kontrolována vizuálně pomocí mikroskopu. Po vizuální kontrole bylo zjištěno, že testované vzorky měly negativní vliv na vlastní buněčný model, kdy byl částečně, nebo zcela rozrušen. Z tohoto důvodu byly počty adherovaných laktobacilů na vlastní buněčný model minimální. Na zbytcích lepku z testovaných vzorků ulpěly kousky buněčné monovrstvy, na které byly společně s lepem adherovány laktobacily. Přítomnost laktobacilů na zbytcích tráveniny potvrdilo fluorescenční měření na čtečce mikrotitračních destiček. V důsledku poškození monovrstev buněčných linií nebylo s výsledky dále počítáno. Výraznou redukci adherovaných laktobacilů znázorňuje obrázek 7. Na obrázku jsou patrné zbytky tráveniny a rozrušená až chybějící buněčná linie. Červený kruh vyznačuje oblast s adherovanými laktobacily (kmen *L. plantarum*) na buněčné linii. Na první pohled je patrné, že došlo k narušení a zničení buněčných linií. Laktobacily tak neměly možnost adherovat a po promytí byly odplaveny pryč. Obrázek 8 ukazuje bakterie přilepené na tráveninu a chybějící vrstvu buněčných linií. Na obrázku je patrná masa tráveniny a zcela zničená buněčná linie. Fluorescenci způsobují bakterie přilepené na tráveninu, označené červeným kruhem. Stejně výsledky byly pozorovány u všech čtyřech testovaných kmenů. Nejvýraznější poškození buněčných linií, a tedy nejvýznamnější inhibice schopnosti adherovat, bylo dosaženo v jamkách, kam byla aplikována trávenina čistého lepku po tepelné úpravě. Obrázek 9 ukazuje prostředí jamky s čistým lepem, který prošel tepelnou úpravou a jeho schopnost narušit buněčné linie. Nejvýrazněji byla schopnost adherence omezena u *L. fermentum*. Nejlépe adheroval kmen *L. gasearii*, avšak i u toho kmene byla patrná výrazná destrukce buněčných linií.

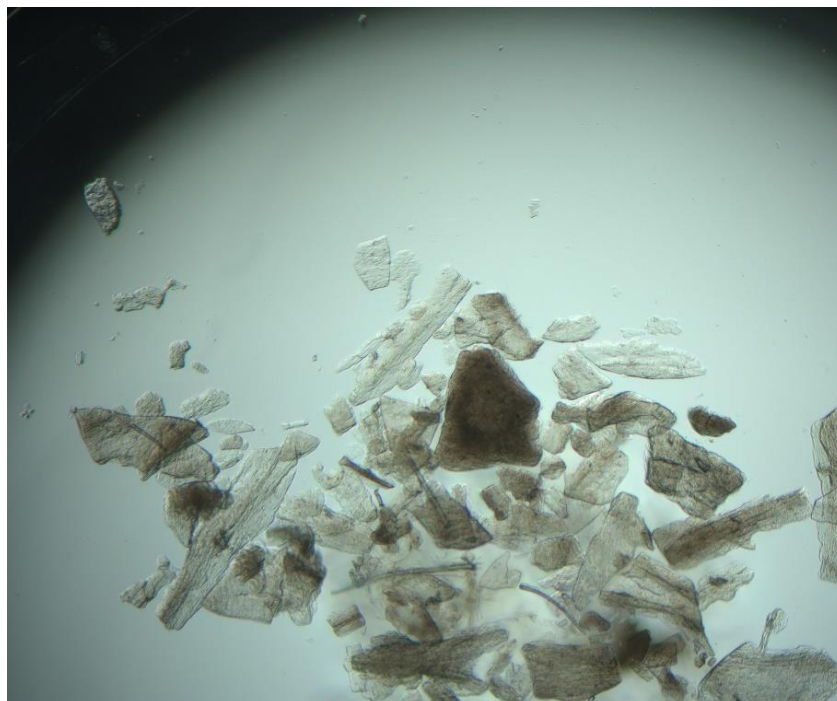


**Obrázek 7:** Adherované buňky *L. plantarum* na buněčné linie za přítomnosti tráveniny (čistý lepek), kdy je patrný výrazný rozdíl ve schopnosti adherence. Zvětšeno 1200×.



**Obrázek 8:** *L. fermentum* adherovaný na tráveninu (chléb Šumava). Patrná je také zcela rozbitá a promytá buněčná linie. Zvětšeno 1200×.





**Obrázek 9:** Zcela zničené buněčné linie kultury na spodu jamky za přítomnosti tráveniny (čistý lepek po tepelné úpravě). Zvětšeno 40×.

V rámci výsledků byla metodika vyhodnocena jako funkční. Metodika je oproti té, která byla použita v bakalářské práci na téma: „Vliv lepku na střevní mikrobiom“, rychlejší, přesnější, snadnější a levnější. Díky zavedení *in vitro* modelu trávení, lze lépe simulovat a pochopit chování lepku v *in vivo* podmínkách. Byla otestována konkrétní dávka tráveniny, která zároveň určila horní limity metodiky.

## 6 Diskuse

Součástí většiny obilnin je lepek, který se díky tomu nachází v celé řadě potravinářských výrobků. Nejčastěji se jedná o pšenici, která je světově nejrozšířenější obilninou pro výrobu potravin. Díky této skutečnosti je lepek naprosto běžnou součástí stravy u většiny populace. (Biesiekierski 2017). Nabízí se otázka, zda stále se zvyšující spotřeba potravin obsahujících lepek příznivě nekoreluje s vyšším výskytem onemocnění trávicího traktu souvisejících s lepkem. Onemocnění vyvolaná konzumací lepku, či způsobená přítomností lepku ve střevní trávenině, zahrnují celiakii, lepkovou intoleranci, nebo alergii na lepek. Existuje tak mnoho onemocnění spojených přímo s lepkem. Z tohoto důvodu je vhodné se lepku věnovat intenzivněji. V současnosti se tyto onemocnění léčí u pacientů striktní bezlepkovou dietou. Jiná léčba, či terapie zatím není dostupná, případně nevykazuje dostatečně přijatelné výsledky (Marciniak et al. 2021). Výraznou roli hraje naše neznalost a nejasnosti toho, jak samotný lepek dokáže způsobovat záněty ve střevní stěně a následně rozvíjet, či přímo způsobovat řadu onemocnění.

To, jak dokáže lepek interagovat a ovlivňovat střevní mikrobiotu, potažmo samotnou střevní sliznici, bylo předmětem této diplomové práce a jí předcházející bakalářské práce. V bakalářské práci na téma: „Vliv lepku na střevní mikrobiom“, jsme prokázali, že lepek brání, či významně ovlivňuje schopnost probiotických mikroorganismů adherovat na buňky střevního epitelu, čímž dokáže bránit rozvoji zdravé mikrobioty, která následně nedokáže plnit svou funkci (Monteagudo-Mera et al. 2019). I v této práci jsme pozorovali výrazně sníženou schopnost bakterií adherovat na buněčný model. Lepek pravděpodobně díky své struktuře dokáže vytvořit bariéru mezi bakteriemi a buněčným modelem a tím bakteriím zabránit v adhezi. Lepek nejenže bránil schopnosti adherovat, ale zároveň dokázal zcela zničit buněčný model. Práce probíhala v *in vitro* podmínkách, nelze tedy s jistotou tvrdit, že se lepek chová stejně agresivně i v případě *in vivo* podmínek v tlustém střevě, neboť v těchto podmínkách působí řada dalších vlivů a lepek jako takový je zde mnohonásobně zředěn. Avšak onemocnění celiakie je typické právě deformací, až silným poškozením střevních klků a krypt (Schuppan et al. 2009; Gutierrez-Achury et al. 2015). Zda by docházelo k podobné destrukci buněk střevní stěny tak, jako v našem případě, kdy došlo k destrukci buněčného modelu, je nejasné. Použitý buněčný model byl obdobný tomu, který byl použit v bakalářské práci, kdy k žádné destrukci buněk nedocházelo.

Pro plné porozumění chování lepku ve střevním prostředí je však potřeba získat více informací o jeho skutečném působení a interakcích. Jedna z možností, jak pozorovat chování lepku je zavedení střevního modelu *in vitro* trávení. Pro potřeby této práce byla použita metodika od (Brodkorb et al. 2019) označená jako INFOGEST 2.0, modelu střevního *in vitro* trávení. Právě tato metoda měla za cíl změnit konzistenci a vlastnosti lepku tak, aby se co nejvíce podobaly lepku, který prošel *in vivo* trávením, ačkoliv se jedná pouze o velmi malé přiblížení. Pracujeme se simulovaným *in vitro* trávicím modelem, který ani zdaleka nedokáže napodobit všechny vlivy, které v lumen střev působí. Dle (Brodkorb et al. 2019) se toto odvětví vyvíjí a samotné metody a modely střevního *in vitro* trávení se snaží stále více napodobit *in vivo* proces trávení. Skupina kolem (Gagliardi et al. 2021) úspěšně otestovala metodu orgánového *ex vivo* systému (*gut-ex-vivo*), pomocí které zkoumala na myších střevech citlivých na lepek, jak gliadin působí na buňky střevní stěny. Jedná se o metodu časově nenáročnou

a nákladově efektivní. Zároveň ve své studii uvádí, že testování na buněčných liniích Caco-2 není v případě sledování chování lepku vhodné, neboť toto působení nedokáže plně rekapitulovat. Avšak nám se i přes to podařilo na tomto buněčném modelu vliv lepku otestovat a dojít k určitým výsledkům, které položily základy budoucímu výzkumu.

Lepek je charakteristický tím, že se využívá jeho vlastností tvořit hustou síť, která například v pekařství dává těstu jeho typické reologické vlastnosti (Biesiekierski 2017). Lepek je zodpovědný za soudržnost a tvarovatelnost těsta, protože při kontaktu s vodou mazovatí a tvoří soudržnou vláknitou síť, která se po průchodu procesem pečení ještě více zpevní (Kucek et al. 2015). V této práci jsme se pokusili pomocí *in vitro* trávicího modelu tuto síť rozbít a zjistit, jak se mění vlastnosti po průchodu gastrointestinálním traktem. Avšak tato síť byla i po průchodu traktem poměrně stabilní, odolná a neustále způsobovala formování tráveniny do kuliček, což potvrzuje její sílu a stabilitu, nebo nedokonalost *in vitro* trávicího modelu. Zde se pravděpodobně jedná o důkaz, že současné *in vitro* modely trávení se stále nedokážou přiblížit prostředí *in vivo* trávení, kdy by jistě došlo k větší míře natrávení (Li et al. 2020b). Současné modely nedokážou plně simulovat střevní motilitu, velmi obtížně se udržuje prostředí typické pro každou fázi trávení a hlavně, zcela vynechávají faktor individuality, neboť v gastrointestinálním traktu každého člověka působí rozdílné vlivy a faktory.

Jeden z těchto faktorů je například zdravotní stav střevního mikrobiomu. Během léčby antibiotiky je obvykle zvýšené riziko vytvoření dysbiózy střevního mikrobiomu. Tento stav pak může mít za následek rozvoj onemocnění, jako jsou v lepším případě zažívací obtíže, nebo v případě nejhorším, zánětlivá onemocnění střev. Je prokázáno, že antibiotika, hlavně ta širokospektrální, mají na střevní mikrobiotu negativní vliv a dokážou zásadně změnit její složení (Lee 2014). V takovém případě se doporučuje začít užívat probiotika. Při užíváním probiotik by mělo být také nahlíženo na stravu, která je přijímána společně s nimi. V této práci jsme potvrdili, že schopnost adherovat, která je pro probiotické mikroorganismy klíčová, je za přítomnosti lepku ve stravě potlačena. Zde se objevuje prostor pro hlubší výzkum toho, jak ve skutečnosti lepek, a jemu obdobné sloučeniny brání právě těmto adhezním schopnostem. Zdravá rezidentní mikrobiota, složená převážně ze zástupců rodů *Lactobacillus spp.* a *Bifidobacterium spp.*, by za normálních zdravých podmínek neměla být ovlivněna, neboť se vyvíjí spolu se svým hostitelem a předpokládá se, že se umí adaptovat (Rogier et al. 2014).

Vyloučit pšeničné výrobky obsahující lepek tak v případě, že je člověk zdravý a netrpí žádnými příznaky intolerance, či alergie, není vhodné. Výrobky z pšeničné mouky mají vysokou výživovou hodnotu, poskytují fermentovatelný substrát pro střevní bakterie, který je pro ně zdrojem energie a ze kterého dokážou produkovat pro hostitele důležité látky, jako například mastné kyseliny s krátkým řetězcem (Hoppe et al. 2017). Právě tyto produkty bakteriální fermentace jsou nezbytné pro tvorbu střevního prostředí příznivého pro rezidentní mikrobiotu a mimo to slouží jako regulátory řady procesů (Kho & Lal 2018). Avšak trpí-li člověk celiakií, či jinými onemocněními spojenými s lepkem, musí být striktní a přísná bezlepková dieta zavedena ihned. Dle (Collado et al. 2009), bezlepková dieta však nedokáže plně napomoci k uzdravení střevní stěny, na které došlo k poškozením vyvolaných celiakií a pacientům tak prozatím nezbývá jiná možnost než držet tento typ diety po celý život.

Zdravý mikrobiom a vyrovnané složení střevní mikrobioty je základem pro správný chod řady procesů v lidském těle. Nelze ponechávat bez povšimnutí vliv stravy na střevní mikrobiotu, a to obzvláště u lidí trpících některými z onemocnění spojených právě se střevní

mikrobiotou. Do budoucna se nabízí provést širší studii na adhezenční schopnosti probiotických mikroorganismů za užití naší metodiky, kdy jsou testované vzorky potravy podrobeny *in vitro* trávení a následně aplikovány na buněčný model střevních buněk, kde probíhá samotná adherence bakterií. V naší studii byl testován pouze lepek a čtyři probiotické kmeny laktobacilů. Studie, která by pracovala s větším počtem probiotických kmenů, a kromě lepku otestovala i další lepku příbuzné bílkoviny, by mohla vnést nový pohled a poskytnout nové poznatky o tom, zda omezuje adhezenční schopnosti mikroorganismů pouze lepek, nebo i jemu podobné látky. Jako lepku podobné sloučeniny by se mohl využít hordein, secalin, nebo avenin, o kterých se hovoří, jako o lepku příbuzných sloučeninách. Zároveň by bylo na místě testování více probiotických mikroorganismů. Stále však pracujeme na úrovni *in vitro* podmínek, které jsou obtížně interpretovatelné do podmínek *in vivo*, avšak rozsáhlejší studie by mohla poskytnou podklady pro budoucí experimenty.

## 7 Závěr

Cílem práce bylo otestovat schopnost probiotických kmenů *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* a *Lactobacillus gasei* adherovat na buněčné linie kultury Caco-2 za přítomnosti lepku, který prošel *in vitro* střevním modelem trávení. Pro vlastní testování adherence byla použita nová metodika, vytvořená úpravami metodiky dle (Jensen et al. 2012). Výsledky ukázaly, že lepek má významný vliv na adhezenční schopnosti probiotik a zároveň významně působí na buňky střevního epitelu. Konzumace pečiva bohatého na lepek by na základě našich poznatků, dokázala potlačit pozitivní efekt konzumace probiotických doplňků stravy, protože probiotika by nemusela být schopna adherovat v prostředí s vyšším obsahem lepku.

Námi testované množství tráveniny bylo pravděpodobně vyšší. Z tohoto důvodu mohlo dojít k zahlcení vzorků tráveninou a následnému zkreslení schopnosti probiotik adherovat. Došlo však k otestování kapacit a limitů této metodiky. Opakování testů s menším množstvím tráveniny již nebylo možné z důvodů časových a dalších omezení způsobených aktuální situací vyvolanou nemocí Covid-19. Do budoucna je zde prostor pro otestování adhezenčních schopností probiotik v prostředí s nižší koncentrací lepku. Nová metodika představuje levnější a rychlejší alternativu, která by po další optimalizaci mohla poskytnout nové a širší poznatky, jak probiotika odolávají prostředí bohatému na lepek.

## 8 Seznam použitých zdrojů

2013. Food labeling: gluten-free labeling of foods. Final rule. Fed Regist **78**:47154-47179.
- Akatsu H, Iwabuchi N, Xiao J-z, Matsuyama Z, Kurihara R, Okuda K, Yamamoto T, Maruyama M. 2013. Clinical Effects of Probiotic Bifidobacterium longum BB536 on Immune Function and Intestinal Microbiota in Elderly Patients Receiving Enteral Tube Feeding. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* **37**:631-640.
- Altenbach SB, Chang HC, Simon-Buss A, Mohr T, Huo N, Gu YQ. 2020. Exploiting the reference genome sequence of hexaploid wheat: a proteomic study of flour proteins from the cultivar Chinese Spring. *Functional & Integrative Genomics* **20**:1-16.
- Amalaradjou MAR, Bhunia AK. 2013. Bioengineered probiotics, a strategic approach to control enteric infections. *Bioengineered* **4**:379-387.
- Amara AA, Shibl A. 2015. Role of Probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management. *Saudi Pharmaceutical Journal* **23**:107-114.
- Arumugam M, et al. 2011. Enterotypes of the human gut microbiome (vol 473, pg 174, 2011). *Nature* **474**:1.
- Azad MA, Sarker M, Li TJ, Yin J. 2018. Probiotic Species in the Modulation of Gut Microbiota: An Overview. *Biomed Research International* **2018**:8.
- Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* **307**:1915-1920.
- Barros L, Retamal C, Torres H, Zuniga RN, Troncoso E. 2016. Development of an in vitro mechanical gastric system (IMGS) with realistic peristalsis to assess lipid digestibility. *Food Research International* **90**:216-225.
- Bascunan KA, Vespa M, Araya M. 2017. Celiac disease: understanding the gluten-free diet. *European Journal of Nutrition* **56**:449-459.
- Behnsen J, Deriu E, Sassone-Corsi M, Raffatellu M. 2013. Probiotics: Properties, Examples, and Specific Applications. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **3**:15.
- Belton PS. 1999. On the elasticity of wheat gluten. *Journal of Cereal Science* **29**:103-107.
- Bennett EP, Mandel U, Clausen H, Gerken TA, Fritz TA, Tabak LA. 2012. Control of mucin-type O-glycosylation: a classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family. *Glycobiology* **22**:736-756.
- Biesiekierski JR. 2017. What is gluten? *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **32**:78-81.
- Binda S, Hill C, Johansen E, Obis D, Pot B, Sanders ME, Tremblay A, Ouwehand AC. 2020. Criteria to Qualify Microorganisms as "Probiotic" in Foods and Dietary Supplements. *Frontiers in Microbiology* **11**:9.
- Black BA, Sun C, Zhao YY, Gänzle MG, Curtis JM. 2013. Antifungal Lipids Produced by Lactobacilli and Their Structural Identification by Normal Phase LC/Atmospheric Pressure Photoionization-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**:5338-5346.
- Booijink CCGM, El-Aidy S, Rajilić-Stojanović M, Heilig HGJ, Troost FJ, Smidt H, Kleerebezem M, De Vos WM, Zoetendal EG. 2010. High temporal and inter-individual variation detected in the human ileal microbiota. *Environmental Microbiology* **12**:3213-3227.
- Bornhorst GM, Paul Singh R. 2014. Gastric Digestion In Vivo and In Vitro: How the Structural Aspects of Food Influence the Digestion Process. *Annual Review of Food Science and Technology* **5**:111-132.

- Brodkorb A, et al. 2019. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols* **14**:991-1014.
- Bromilow S, Gethings LA, Buckley M, Bromley M, Shewry PR, Langridge JI, Mills ENC. 2017. A curated gluten protein sequence database to support development of proteomics methods for determination of gluten in gluten-free foods. *Journal of Proteomics* **163**:67-75.
- Bromilow SN, Gethings LA, Langridge JI, Shewry PR, Buckley M, Bromley MJ, Mills EN. 2016. Comprehensive Proteomic Profiling of Wheat Gluten Using a Combination of Data-Independent and Data-Dependent Acquisition. *Front Plant Sci* **7**:2020.
- Bron PA, van Baarlen P, Kleerebezem M. 2012. Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa. *Nature Reviews Microbiology* **10**:66-78.
- Brooks L, et al. 2017. Fermentable carbohydrate stimulates FFAR2-dependent colonic PYY cell expansion to increase satiety. *Molecular Metabolism* **6**:48-60.
- Brown JM, Hazen SL. 2018. Microbial modulation of cardiovascular disease. *Nature Reviews Microbiology* **16**:171-181.
- Butel MJ. 2014. Probiotics, gut microbiota and health. *Medecine Et Maladies Infectieuses* **44**:1-8.
- Cabinian A, Sinsimer D, Tang M, Jang Y, Choi B, Laouar Y, Laouar A. 2018. Gut symbiotic microbes imprint intestinal immune cells with the innate receptor SLAMF4 which contributes to gut immune protection against enteric pathogens. *Gut* **67**:847.
- Campbell J, Berry J, Liang Y. 2019. Chapter 71 - Anatomy and Physiology of the Small Intestine. Pages 817-841 in Yeo CJ, editor. *Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract, 2 Volume Set (Eighth Edition)*. Elsevier, Philadelphia.
- Cani PD. 2017. Gut cell metabolism shapes the microbiome. *Science* **357**:548.
- Cani PD. 2018. Human gut microbiome: hopes, threats and promises. *Gut* **67**:1716-1725.
- Carvalho-Wells AL, Helmolz K, Nodet C, Molzer C, Leonard C, McKevith B, Thielecke F, Jackson KG, Tuohy KM. 2010. Determination of the in vivo prebiotic potential of a maize-based whole grain breakfast cereal: a human feeding study. *British Journal of Nutrition* **104**:1353-1356.
- Ceapa C, Wopereis H, Rezaiki L, Kleerebezem M, Knol J, Oozeer R. 2013. Influence of fermented milk products, prebiotics and probiotics on microbiota composition and health. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* **27**:139-155.
- Chen JS, Gaikwad V, Holmes M, Murray B, Povey M, Wang Y, Zhang Y. 2011. Development of a simple model device for in vitro gastric digestion investigation. *Food & Function* **2**:174-182.
- Chen T, Kim CY, Kaur A, Lamothe L, Shaikh M, Keshavarzian A, Hamaker BR. 2017. Dietary fibre-based SCFA mixtures promote both protection and repair of intestinal epithelial barrier function in a Caco-2 cell model. *Food & Function* **8**:1166-1173.
- Clarke SF, et al. 2014. Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. *Gut* **63**:1913.
- Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R. 2012. The Impact of the Gut Microbiota on Human Health: An Integrative View. *Cell* **148**:1258-1270.
- Collado MC, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. 2009. Specific duodenal and faecal bacterial groups associated with paediatric coeliac disease. *Journal of Clinical Pathology* **62**:264-269.

- Collado MC, Surono IS, Meriluoto J, Salminen S. 2007. Potential Probiotic Characteristics of Lactobacillus and Enterococcus Strains Isolated from Traditional Dadih Fermented Milk against Pathogen Intestinal Colonization. *Journal of Food Protection* **70**:700-705.
- Cooke G, Behan J, Costello M. 2006. Newly identified vitamin K-producing bacteria isolated from the neonatal faecal flora. *Microbial Ecology in Health and Disease* **18**:133-138.
- Cortés-Zavaleta O, López-Malo A, Hernández-Mendoza A, García HS. 2014. Antifungal activity of lactobacilli and its relationship with 3-phenyllactic acid production. *International Journal of Food Microbiology* **173**:30-35.
- Costabile A, et al. 2012. Impact of polydextrose on the faecal microbiota: a double-blind, crossover, placebo-controlled feeding study in healthy human subjects. *British Journal of Nutrition* **108**:471-481.
- Cotillard A, et al. 2013. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature* **500**:585-588.
- Culligan EP, Hill C, Sleator RD. 2009. Probiotics and gastrointestinal disease: successes, problems and future prospects. *Gut Pathogens* **1**:19.
- Dana ML, Trent S, Cecilia MS, Kiran DKA, James WF. 2015. Exploring the Popularity, Experiences, and Beliefs Surrounding Gluten-Free Diets in Nonceliac Athletes. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism* **25**:37-45.
- Daum S, Bauer U, Foss HD, Schuppan D, Stein H, Riecken EO, Ullrich R. 1999. Increased expression of mRNA for matrix metalloproteinases-1 and -3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in intestinal biopsy specimens from patients with coeliac disease. *Gut* **44**:17.
- David LA, et al. 2014. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* **505**:559-563.
- De Filippis F, et al. 2016. High-level adherence to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome. *Gut* **65**:1812.
- De Gregorio PR, Tomás MSJ, Terraf MCL, Nader-Macías MEF. 2014. In vitro and in vivo effects of beneficial vaginal lactobacilli on pathogens responsible for urogenital tract infections. *J Med Microbiol* **63**:685-696.
- de Vrese M, Schrezenmeir J. 2008. Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. Pages 1-66 in Stahl U, Donalies UEB, and Nevoigt E, editors. *Food Biotechnology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Degnan Patrick H, Taga Michiko E, Goodman Andrew L. 2014. Vitamin B12 as a Modulator of Gut Microbial Ecology. *Cell Metabolism* **20**:769-778.
- del Campo R, et al. 2014. Improvement of digestive health and reduction in proteobacterial populations in the gut microbiota of cystic fibrosis patients using a Lactobacillus reuteri probiotic preparation: A double blind prospective study. *Journal of Cystic Fibrosis* **13**:716-722.
- Denou E, et al. 2015. Defective NOD2 peptidoglycan sensing promotes diet-induced inflammation, dysbiosis, and insulin resistance. *EMBO Molecular Medicine* **7**:259-274.
- Desseyn JL, Aubert JP, Porchet N, Laine A. 2000. Evolution of the large secreted gel-forming mucins. *Mol Biol Evol* **17**:1175-1184.
- do Nascimento AB, Fiates GMR, dos Anjos A, Teixeira E. 2013. Analysis of ingredient lists of commercially available gluten-free and gluten-containing food products using the text mining technique. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **64**:217-222.
- Dobson A, Cotter PD, Ross RP, Hill C. 2012. Bacteriocin Production: a Probiotic Trait? *Applied and Environmental Microbiology* **78**:1.



- Dominika Ś, Arjan N, Karyn RP, Henryk K. 2011. The study on the impact of glycosylated pea proteins on human intestinal bacteria. *International Journal of Food Microbiology* **145**:267-272.
- Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK. 2016. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol* **14**:20-32.
- Donohoe DR, Garge N, Zhang XX, Sun W, O'Connell TM, Bunger MK, Bultman SJ. 2011. The Microbiome and Butyrate Regulate Energy Metabolism and Autophagy in the Mammalian Colon. *Cell Metabolism* **13**:517-526.
- El Aidy S, et al. 2012. Temporal and spatial interplay of microbiota and intestinal mucosa drive establishment of immune homeostasis in conventionalized mice. *Mucosal Immunology* **5**:567-579.
- Englyst HN, Kingman SM, Cummings JH. 1992. CLASSIFICATION AND MEASUREMENT OF NUTRITIONALLY IMPORTANT STARCH FRACTIONS. *European Journal of Clinical Nutrition* **46**:S33-S50.
- Fasano A, Sapone A, Zevallos V, Schuppan D. 2015. Nonceliac Gluten Sensitivity. *Gastroenterology* **148**:1195-1204.
- Fava F, Gitau R, Griffin BA, Gibson GR, Tuohy KM, Lovegrove JA. 2013. The type and quantity of dietary fat and carbohydrate alter faecal microbiome and short-chain fatty acid excretion in a metabolic syndrome 'at-risk' population. *International Journal of Obesity* **37**:216-223.
- Foligné B, Parayre S, Cheddani R, Famelart M-H, Madec M-N, Plé C, Breton J, Dewulf J, Jan G, Deutsch S-M. 2016. Immunomodulation properties of multi-species fermented milks. *Food Microbiology* **53**:60-69.
- Forde A, Hill C. 2018. Phages of life – the path to pharma. *British Journal of Pharmacology* **175**:412-418.
- Francavilla R, et al. 2012. Effect of lactose on gut microbiota and metabolome of infants with cow's milk allergy. *Pediatric Allergy and Immunology* **23**:420-427.
- François IEJA, et al. 2014. Effects of Wheat Bran Extract Containing Arabinoxylan Oligosaccharides on Gastrointestinal Parameters in Healthy Preadolescent Children. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* **58**.
- Gagliardi M, et al. 2021. Gut-Ex-Vivo system as a model to study gluten response in celiac disease. *Cell Death Discovery* **7**:45.
- Garriga M, Rubio R, Aymerich T, Ruas-Madiedo P. 2015. Potentially probiotic and bioprotective lactic acid bacteria starter cultures antagonise the *Listeria monocytogenes* adhesion to HT29 colonocyte-like cells. *Benef Microbes* **6**:337-343.
- Gasbarrini G, Bonvicini F, Gramenzi A. 2016. Probiotics History. *Journal of Clinical Gastroenterology* **50**:S116-S119.
- Geleijnse JM, Vermeer C, Grobbee DE, Schurgers LJ, Knapen MHJ, van der Meer IM, Hofman A, Witteman JCM. 2004. Dietary Intake of Menaquinone Is Associated with a Reduced Risk of Coronary Heart Disease: The Rotterdam Study. *The Journal of Nutrition* **134**:3100-3105.
- Gilissen L, van der Meer IM, Smulders MJM. 2014. Reducing the incidence of allergy and intolerance to cereals. *Journal of Cereal Science* **59**:337-353.
- Gill SR, Pop M, DeBoy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, Gordon JI, Relman DA, Fraser-Liggett CM, Nelson KE. 2006. Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. *Science* **312**:1355.

- Gomes JMG, Costa JD, Alfenas RDG. 2017. Metabolic endotoxemia and diabetes mellitus: A systematic review. *Metabolism-Clinical and Experimental* **68**:133-144.
- Gominak SC. 2016. Vitamin D deficiency changes the intestinal microbiome reducing B vitamin production in the gut. The resulting lack of pantothenic acid adversely affects the immune system, producing a “pro-inflammatory” state associated with atherosclerosis and autoimmunity. *Medical Hypotheses* **94**:103-107.
- Goossens DAM, Jonkers DMAE, Russel MGVM, Stobberingh EE, Stockbrügger RW. 2006. The effect of a probiotic drink with *Lactobacillus plantarum* 299v on the bacterial composition in faeces and mucosal biopsies of rectum and ascending colon. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* **23**:255-263.
- Guerra A, Etienne-Mesmin L, Livrelli V, Denis S, Blanquet-Diot S, Alric M. 2012. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in Biotechnology* **30**:591-600.
- Gutierrez-Achury J, Zhernakova A, Pulit SL, Trynka G, Hunt KA, Romanos J, Raychaudhuri S, van Heel DA, Wijmenga C, de Balcker PIW. 2015. Fine mapping in the MHC region accounts for 18% additional genetic risk for celiac disease. *Nature Genetics* **47**:577-578.
- Haddaji N, Mahdhi AK, Krifi B, Ismail MB, Bakhrouf A. 2015. Change in cell surface properties of *Lactobacillus casei* under heat shock treatment. *FEMS Microbiology Letters* **362**.
- Halmos EP, Christophersen CT, Bird AR, Shepherd SJ, Gibson PR, Muir JG. 2015. Diets that differ in their FODMAP content alter the colonic luminal microenvironment. *Gut* **64**:93.
- Hamdan AM, El-Sayed AFM, Mahmoud MM. 2016. Effects of a novel marine probiotic, *Lactobacillus plantarum* AH 78, on growth performance and immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Applied Microbiology* **120**:1061-1073.
- Hardy H, Harris J, Lyon E, Beal J, Foey AD. 2013. Probiotics, Prebiotics and Immunomodulation of Gut Mucosal Defences: Homeostasis and Immunopathology. *Nutrients* **5**.
- He JB, Penson S, Powers SJ, Hawes C, Shewry PR, Tosi P. 2013. Spatial Patterns of Gluten Protein and Polymer Distribution in Wheat Grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**:6207-6215.
- Hentges DJ, Maier BR, Burton GC, Flynn MA, Tsutakawa RK. 1977. Effect of a High-Beef Diet on the Fecal Bacterial Flora of Humans. *Cancer Research* **37**:568.
- Hidalgo-Cantabrana C, Nikolic M, Lopez P, Suarez A, Miljkovic M, Kojic M, Margolles A, Golic N, Ruas-Madiedo P. 2014. Exopolysaccharide-producing *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* strains and their polymers elicit different responses on immune cells from blood and gut associated lymphoid tissue. *Anaerobe* **26**:24-30.
- Hischenhuber C, Crevel R, Jarry B, MÄKi M, Moneret-Vautrin DA, Romano A, Troncone R, Ward R. 2006. Review article: safe amounts of gluten for patients with wheat allergy or coeliac disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* **23**:559-575.
- Hoppe C, Gobel R, Kristensen M, Lind MV, Matthiessen J, Christensen T, Trolle E, Fagt S, Madsen ML, Husby S. 2017. Intake and sources of gluten in 20-to 75-year-old Danish adults: a national dietary survey. *European Journal of Nutrition* **56**:107-117.
- Hopper AD, Cross SS, Hurlstone DP, McAlindon ME, Lobo AJ, Hadjivassiliou M, Sloan ME, Dixon S, Sanders DS. 2007. Pre-endoscopy serological testing for coeliac disease: evaluation of a clinical decision tool. *BMJ* **334**:729.
- Hospenthal MK, Costa TRD, Waksman G. 2017. A comprehensive guide to pilus biogenesis in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol* **15**:365-379.

- Huo N, et al. 2018. Gene Duplication and Evolution Dynamics in the Homeologous Regions Harboring Multiple Prolamin and Resistance Gene Families in Hexaploid Wheat. *Frontiers in Plant Science* **9**:673.
- Husted AS, Trauelsen M, Rudenko O, Hjorth SA, Schwartz TW. 2017. GPCR-Mediated Signaling of Metabolites. *Cell Metabolism* **25**:777-796.
- Hymes JP, Johnson BR, Barrangou R, Klaenhammer TR. 2016. Functional Analysis of an S-Layer-Associated Fibronectin-Binding Protein in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Applied and Environmental Microbiology* **82**:2676.
- Jackson SA, Schoeni JL, Vegge C, Pane M, Stahl B, Bradley M, Goldman VS, Burguière P, Atwater JB, Sanders ME. 2019. Improving End-User Trust in the Quality of Commercial Probiotic Products. *Frontiers in Microbiology* **10**:739.
- Jalili-Firoozinezhad S, et al. 2019. A complex human gut microbiome cultured in an anaerobic intestine-on-a-chip. *Nature Biomedical Engineering* **3**:520-531.
- 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**:216-222.
- Johansson MEV, et al. 2011. Composition and functional role of the mucus layers in the intestine. *Cellular and Molecular Life Sciences* **68**:3635.
- Juhász A, et al. 2018. Genome mapping of seed-borne allergens and immunoresponsive proteins in wheat. *Science Advances* **4**:15.
- Junker Y, et al. 2012. Wheat amylase trypsin inhibitors drive intestinal inflammation via activation of toll-like receptor 4. *Journal of Experimental Medicine* **209**:2395-2408.
- Juntunen M, Kirjavainen PV, Ouwehand AC, Salminen SJ, Isolauri E. 2001. Adherence of Probiotic Bacteria to Human Intestinal Mucus in Healthy Infants and during Rotavirus Infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **8**:293.
- Kagnoff MF. 2007. Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease. *The Journal of Clinical Investigation* **117**:41-49.
- Keim NL, Martin RJ. 2014. Dietary Whole Grain–Microbiota Interactions: Insights into Mechanisms for Human Health. *Advances in Nutrition* **5**:556-557.
- Kho ZY, Lal SK. 2018. The Human Gut Microbiome - A Potential Controller of Wellness and Disease. *Frontiers in Microbiology* **9**:23.
- Kim CH, Park J, Kim M. 2014. Gut Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids, T Cells, and Inflammation. in **14**:277-288.
- Kim T-S, Hur J-W, Yu M-A, Cheigh C-I, Kim K-N, Hwang J-K, Pyun Y-R. 2003. Antagonism of *Helicobacter pylori* by Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Journal of Food Protection* **66**:3-12.
- Kim YS, Ho SB. 2010. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr Gastroenterol Rep* **12**:319-330.
- Kleerebezem M, Vaughan EE. 2009. Probiotic and Gut Lactobacilli and Bifidobacteria: Molecular Approaches to Study Diversity and Activity. *Annual Review of Microbiology* **63**:269-290.
- Kong F, Singh RP. 2008. Disintegration of Solid Foods in Human Stomach. *Journal of Food Science* **73**:R67-R80.
- Koropatkin NM, Cameron EA, Martens EC. 2012. How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. *Nat Rev Microbiol* **10**:323-335.

- Kucek LK, Veenstra LD, Amnuaycheewa P, Sorrells ME. 2015. A Grounded Guide to Gluten: How Modern Genotypes and Processing Impact Wheat Sensitivity. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **14**:285-302.
- Kupper C. 2005. Dietary guidelines and implementation for celiac disease. *Gastroenterology* **128**:S121-S127.
- Kwak DS, et al. 2014. Short-term probiotic therapy alleviates small intestinal bacterial overgrowth, but does not improve intestinal permeability in chronic liver disease. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* **26**.
- König J, Wells J, Cani PD, García-Ródenas CL, MacDonald T, Mercenier A, Whyte J, Troost F, Brummer R-J. 2016. Human Intestinal Barrier Function in Health and Disease. *Clinical and translational gastroenterology* **7**:e196-e196.
- La Vieille S, Dubois S, Hayward S, Koerner TB. 2014. Estimated Levels of Gluten Incidentally Present in a Canadian Gluten-Free Diet. *Nutrients* **6**.
- Lawley TD, Walker AW. 2013. Intestinal colonization resistance. *Immunology* **138**:1-11.
- Lebeer S, et al. 2012. Functional analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG pili in relation to adhesion and immunomodulatory interactions with intestinal epithelial cells. *Appl Environ Microbiol* **78**:185-193.
- Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SCJ. 2008. Genes and Molecules of *Lactobacilli* Supporting Probiotic Action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **72**:728-+.
- Lebwohl B, Ludvigsson JF, Green PHR. 2015. Celiac disease and non-celiac gluten sensitivity. *BMJ : British Medical Journal* **351**:h4347.
- Lee YK. 2014. What could probiotic do for us? *Food Science and Human Wellness* **3**:47-50.
- Lehri B, Seddon AM, Karlyshev AV. 2015. *Lactobacillus fermentum* 3872 genome sequencing reveals plasmid and chromosomal genes potentially involved in a probiotic activity. *FEMS Microbiology Letters* **362**.
- Leitch ECM, Walker AW, Duncan SH, Holtrop G, Flint HJ. 2007. Selective colonization of insoluble substrates by human faecal bacteria. *Environmental Microbiology* **9**:667-679.
- Li C, Yu W, Wu P, Chen XD. 2020a. Current in vitro digestion systems for understanding food digestion in human upper gastrointestinal tract. *Trends in Food Science & Technology* **96**:114-126.
- Li C, Yu WW, Wu P, Chen XD. 2020b. Current in vitro digestion systems for understanding food digestion in human upper gastrointestinal tract. *Trends in Food Science & Technology* **96**:114-126.
- Liu J-E, Zhang Y, Zhang J, Dong P-L, Chen M, Duan Z-P. 2010. Probiotic Yogurt Effects on Intestinal Flora of Patients with Chronic Liver Disease. *Nursing Research* **59**.
- Liu Z, Lin X, Huang G, Zhang W, Rao P, Ni L. 2014. Prebiotic effects of almonds and almond skins on intestinal microbiota in healthy adult humans. *Anaerobe* **26**:1-6.
- Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. 2012. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* **489**:220-230.
- Ludvigsson JF, Green PH. 2011. Clinical management of coeliac disease. *Journal of Internal Medicine* **269**:560-571.
- Ludvigsson JF, et al. 2013. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut* **62**:43-52.
- Lundin KE, Nilsen EM, Scott HG, Loberg EM, Gjoen A, Bratlie J, Skar V, Mendez E, Lovik A, Kett K. 2003. Oats induced villous atrophy in coeliac disease. *Gut* **52**:1649-1652.
- Magalhaes I, et al. 2015. Mucosal-associated invariant T cell alterations in obese and type 2 diabetic patients. *The Journal of Clinical Investigation* **125**:1752-1762.

- Mai V, Waugh S, Byrd D, Simpson D, Ukhanova M. 2017. Novel encapsulation improves recovery of probiotic strains in fecal samples of human volunteers. *Appl Microbiol Biotechnol* **101**:1419-1425.
- Marciniak M, Szymczak-Tomczak A, Mahadea D, Eder P, Dobrowolska A, Krela-Kaźmierczak I. 2021. Multidimensional Disadvantages of a Gluten-Free Diet in Celiac Disease: A Narrative Review. *Nutrients* **13**.
- Marze S. 2017. Bioavailability of Nutrients and Micronutrients: Advances in Modeling and In Vitro Approaches. Pages 35-55 in Doyle MP, and Klaenhammer TR, editors. *Annual Review of Food Science and Technology*, Vol 8. Annual Reviews, Palo Alto.
- Maslowski KM, et al. 2009. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature* **461**:1282-1286.
- Mathipa MG, Thantsha MS. 2017. Probiotic engineering: towards development of robust probiotic strains with enhanced functional properties and for targeted control of enteric pathogens. *Gut Pathogens* **9**:28.
- Matsumoto K, Takada T, Shimizu K, Moriyama K, Kawakami K, Hirano K, Kajimoto O, Nomoto K. 2010. Effects of a probiotic fermented milk beverage containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on defecation frequency, intestinal microbiota, and the intestinal environment of healthy individuals with soft stools. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **110**:547-552.
- McAllister BP, Williams E, Clarke K. 2019. A Comprehensive Review of Celiac Disease/Gluten-Sensitive Enteropathies. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* **57**:226-243.
- McFarland LV. 2007. Meta-analysis of probiotics for the prevention of traveler's diarrhea. *Travel Medicine and Infectious Disease* **5**:97-105.
- McFarland LV. 2015. From Yaks to Yogurt: The History, Development, and Current Use of Probiotics. *Clinical Infectious Diseases* **60**:S85-S90.
- McKenzie C, Tan J, Macia L, Mackay CR. 2017. The nutrition-gut microbiome-physiology axis and allergic diseases. *Immunological Reviews* **278**:277-295.
- Meeuwisse GW. 1970. Diagnostic criteria in coeliac disease. *Acta Paediatr. Scand.* **59**:461-463.
- Miao M, Jiang B, Cui SW, Zhang T, Jin Z. 2015. Slowly Digestible Starch—A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **55**:1642-1657.
- Milani C, et al. 2017. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **81**:e00036-00017.
- Minekus M, et al. 2014a. A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food & Function* **5**:1113-1124.
- Minekus M, et al. 2014b. A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food & Function* **5**:1113-1124.
- Monteagudo-Mera A, Rastall RA, Gibson GR, Charalampopoulos D, Chatzifragkou A. 2019. Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. *Applied Microbiology and Biotechnology* **103**:6463-6472.
- Monteagudo-Mera A, Rodriguez-Aparicio L, Rua J, Martinez-Blanco H, Navasa N, Garcia-Armesto MR, Ferrero MA. 2012. In vitro evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. *Journal of Functional Foods* **4**:531-541.
- Monteiro-Sepulveda M, et al. 2015. Jejunal T Cell Inflammation in Human Obesity Correlates with Decreased Enterocyte Insulin Signaling. *Cell Metabolism* **22**:113-124.

- Mowat AM, Agace WW. 2014. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nature Reviews Immunology* **14**:667-685.
- Mukherjee R, Kelly CP, Schuppan D. 2012. Nondietary Therapies for Celiac Disease. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America* **22**:811-831.
- Muñoz-Provencio D, Rodríguez-Díaz J, Collado MC, Langella P, Bermúdez-Humarán LG, Monedero V. 2012. Functional analysis of the *Lactobacillus casei* BL23 sortases. *Appl Environ Microbiol* **78**:8684-8693.
- Nasr I, Leffler DA, Ciclitira PJ. 2012. Management of Celiac Disease. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America* **22**:695-704.
- Nicholson JK, Holmes E, Wilson ID. 2005. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. *Nature Reviews Microbiology* **3**:431-438.
- Norton JE, Wallis GA, Spyropoulos F, Lillford PJ, Norton IT. 2014. Designing Food Structures for Nutrition and Health Benefits. *Annual Review of Food Science and Technology* **5**:177-195.
- O'Neill LA, Golenbock D, Bowie AG. 2013. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. Pages 453-460. *Nat Rev Immunol*, England.
- Ohland CL, MacNaughton WK. 2010. Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **298**:G807-G819.
- Pandey KR, Naik SR, Vakil BV. 2015a. Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. *Journal of Food Science and Technology-Mysore* **52**:7577-7587.
- Pandey KR, Naik SR, Vakil BV. 2015b. Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. *Journal of Food Science and Technology* **52**:7577-7587.
- Park D, Brune KA, Mitra A, Marusina AI, Maverakis E, Lebrilla CB. 2015. Characteristic Changes in Cell Surface Glycosylation Accompany Intestinal Epithelial Cell (IEC) Differentiation: High Mannose Structures Dominate the Cell Surface Glycome of Undifferentiated Enterocytes. *Mol Cell Proteomics* **14**:2910-2921.
- Paust S, Lu L, McCarty N, Cantor H. 2004. Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**:10398.
- Payne AN, Chassard C, Banz Y, Lacroix C. 2012. The composition and metabolic activity of child gut microbiota demonstrate differential adaptation to varied nutrient loads in an in vitro model of colonic fermentation. *FEMS Microbiology Ecology* **80**:608-623.
- Peng L, He Z, Chen W, Holzman IR, Lin J. 2007. Effects of Butyrate on Intestinal Barrier Function in a Caco-2 Cell Monolayer Model of Intestinal Barrier. *Pediatric Research* **61**:37-41.
- Perry RJ, Peng L, Barry NA, Cline GW, Zhang DY, Cardone RL, Petersen KF, Kibbey RG, Goodman AL, Shulman GI. 2016. Acetate mediates a microbiome-brain-beta-cell axis to promote metabolic syndrome. *Nature* **534**:213-+.
- Phillips ML. 2006. Interdomain interactions: Dissecting animal bacterial Symbioses. *Bioscience* **56**:376-381.
- Piepenbrink KH, Sundberg EJ. 2016. Motility and adhesion through type IV pili in Gram-positive bacteria. *Biochem Soc Trans* **44**:1659-1666.
- Pistollato F, Sumalla Cano S, Elio I, Masias Vergara M, Giampieri F, Battino M. 2016. Role of gut microbiota and nutrients in amyloid formation and pathogenesis of Alzheimer disease. *Nutrition Reviews* **74**:624-634.

- Popowska M, Krawczyk-Balska A, Ostrowski R, Desvaux M. 2017. InIL from *Listeria monocytogenes* Is Involved in Biofilm Formation and Adhesion to Mucin. *Frontiers in Microbiology* **8**:660.
- Postler TS, Ghosh S. 2017. Understanding the Holobiont: How Microbial Metabolites Affect Human Health and Shape the Immune System. *Cell Metabolism* **26**:110-130.
- Radilla-Vázquez RB, Parra-Rojas I, Martínez-Hernández NE, Márquez-Sandoval YF, Illades-Aguilar B, Castro-Alarcón N. 2016. Gut Microbiota and Metabolic Endotoxemia in Young Obese Mexican Subjects. *Obesity Facts* **9**:1-11.
- Radziwill-Bienkowska JM, Robert V, Drabot K, Chain F, Cherbuy C, Langella P, Thomas M, Bardowski JK, Mercier-Bonin M, Kowalczyk M. 2017. Contribution of plasmid-encoded peptidase S8 (PrtP) to adhesion and transit in the gut of *Lactococcus lactis* IBB477 strain. *Appl Microbiol Biotechnol* **101**:5709-5721.
- Rahaie S, Gharibzahedi SMT, Razavi SH, Jafari SM. 2014. Recent developments on new formulations based on nutrient-dense ingredients for the production of healthy-functional bread: a review. *Journal of Food Science and Technology* **51**:2896-2906.
- Raigond P, Ezekiel R, Raigond B. 2015. Resistant starch in food: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **95**:1968-1978.
- Rajilic-Stojanovic M, Smidt H, de Vos WM. 2007. Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. *Environmental Microbiology* **9**:2125-2136.
- Rajkumar H, Mahmood N, Kumar M, Varikuti SR, Challa HR, Myakala SP. 2014. Effect of Probiotic (VSL#3) and Omega-3 on Lipid Profile, Insulin Sensitivity, Inflammatory Markers, and Gut Colonization in Overweight Adults: A Randomized, Controlled Trial. *Mediators of Inflammation* **2014**:348959.
- Rastelli M, Knauf C, Cani PD. 2018. Gut Microbes and Health: A Focus on the Mechanisms Linking Microbes, Obesity, and Related Disorders. *Obesity* **26**:792-800.
- Rattanachaikunsopon P, Phumkhachorn P. 2010. Antimicrobial Activity of Basil (*Ocimum basilicum*) Oil against *Salmonella* Enteritidis in Vitro and in Food. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **74**:1200-1204.
- Riasat GN, Riasat Z, Aslam I. 2016. Effects of nanoparticles on gastrointestinal disorders and therapy. *J. Clin. Toxicol* **6**:313.
- Ringot-Destrez B, D'Alessandro Z, Lacroix J-M, Mercier-Bonin M, Léonard R, Robbe-Masselot C. 2018. A Sensitive and Rapid Method to Determine the Adhesion Capacity of Probiotics and Pathogenic Microorganisms to Human Gastrointestinal Mucins. *Microorganisms* **6**.
- Rivera-Chávez F, Lopez CA, Bäumler AJ. 2017. Oxygen as a driver of gut dysbiosis. *Free Radical Biology and Medicine* **105**:93-101.
- Rogier EW, Frantz AL, Bruno MEC, Wedlund L, Cohen DA, Stromberg AJ, Kaetzel CS. 2014. Lessons from mother: Long-term impact of antibodies in breast milk on the gut microbiota and intestinal immune system of breastfed offspring. *Gut Microbes* **5**:663-668.
- Salles C, Chagnon M-C, Feron G, Guichard E, Laboure H, Morzel M, Semon E, Tarrega A, Yven C. 2010. In-Mouth Mechanisms Leading to Flavor Release and Perception. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **51**:67-90.
- Saltiel AR. 2016. Insulin Signaling in the Control of Glucose and Lipid Homeostasis. Pages 51-71 in Herzig S, editor. *Metabolic Control*. Springer International Publishing, Cham.

- Samuel BS, et al. 2008. Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**:16767.
- Schuppan D, Junker Y, Barisani D. 2009. Celiac Disease: From Pathogenesis to Novel Therapies. *Gastroenterology* **137**:1912-1933.
- Schwarzer M, et al. 2016. *Lactobacillus plantarum* strain maintains growth of infant mice during chronic undernutrition. *Science* **351**:854.
- Servin AL. 2004. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews* **28**:405-440.
- Shani-Levi C, et al. 2017. 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 J, Zuo Z-X, Mao A-P. 2014. Effect of Probiotics on Inducing Remission and Maintaining Therapy in Ulcerative Colitis, Crohn's Disease, and Pouchitis: Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Inflammatory Bowel Diseases* **20**:21-35.
- Shewry P. 2019. What Is Gluten-Why Is It Special? *Frontiers in Nutrition* **6**:10.
- Shewry PR. 2009. Wheat. *Journal of Experimental Botany* **60**:1537-1553.
- Shewry PR, Tatham AS. 2016. Improving wheat to remove coeliac epitopes but retain functionality. *Journal of Cereal Science* **67**:12-21.
- Singh RK, et al. 2017. Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *Journal of Translational Medicine* **15**:17.
- Sleytr UB, Schuster B, Egelseer EM, Pum D. 2014. S-layers: principles and applications. *FEMS Microbiol Rev* **38**:823-864.
- Sollid LM, Qiao SW, Anderson RP, Gianfrani C, Koning F. 2012. Nomenclature and listing of celiac disease relevant gluten T-cell epitopes restricted by HLA-DQ molecules. *Immunogenetics* **64**:455-460.
- Sonnenburg Erica D, Sonnenburg Justin L. 2014. Starving our Microbial Self: The Deleterious Consequences of a Diet Deficient in Microbiota-Accessible Carbohydrates. *Cell Metabolism* **20**:779-786.
- Spaenij-Dekking L, Kooy-Winkelaar Y, van Veelen P, Wouter Drijfhout J, Jonker H, van Soest L, Smulders MJM, Bosch D, Gilissen LJWJ, Koning F. 2005. Natural Variation in Toxicity of Wheat: Potential for Selection of Nontoxic Varieties for Celiac Disease Patients. *Gastroenterology* **129**:797-806.
- Sprockett D, Fukami T, Relman DA. 2018. Role of priority effects in the early-life assembly of the gut microbiota. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* **15**:197-205.
- Staels B, Fonseca VA. 2009. Bile Acids and Metabolic Regulation. *Diabetes Care* **32**:S237.
- Stevens JE, Jones KL, Rayner CK, Horowitz M. 2013. Pathophysiology and pharmacotherapy of gastroparesis: current and future perspectives. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* **14**:1171-1186.
- Suez J, et al. 2014. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature* **514**:181-186.
- Todorov SD, Botes M, Guigas C, Schillinger U, Wiid I, Wachsman MB, Holzapfel WH, Dicks LMT. 2008. Boza, a natural source of probiotic lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology* **104**:465-477.
- Topping DL, Clifton PM. 2001. Short-Chain Fatty Acids and Human Colonic Function: Roles of Resistant Starch and Nonstarch Polysaccharides. *Physiological Reviews* **81**:1031-1064.



- Tosi P. 2012. Trafficking and deposition of prolamins in wheat. *Journal of Cereal Science* **56**:81-90.
- Tosi P, He JB, Lovegrove A, Gonzales-Thuillier I, Penson S, Shewry PR. 2018. Gradients in compositions in the starchy endosperm of wheat have implications for milling and processing. *Trends in Food Science & Technology* **82**:1-7.
- Tuo Y, Yu H, Ai L, Wu Z, Guo B, Chen W. 2013. Aggregation and adhesion properties of 22 *Lactobacillus* strains. *J Dairy Sci* **96**:4252-4257.
- Turpin W, Humblot C, Thomas M, Guyot J-P. 2010. *Lactobacilli* as multifaceted probiotics with poorly disclosed molecular mechanisms. *International Journal of Food Microbiology* **143**:87-102.
- Turroni F, Ventura M, Buttó LF, Duranti S, O'Toole PW, Motherway MOC, van Sinderen D. 2014. Molecular dialogue between the human gut microbiota and the host: a *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* perspective. *Cellular and Molecular Life Sciences* **71**:183-203.
- Van Tassell ML, Miller MJ. 2011. *Lactobacillus* adhesion to mucus. *Nutrients* **3**:613-636.
- Vasijevec T, Shah NP. 2008. Probiotics - From Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal* **18**:714-728.
- Vilà B, Esteve-Garcia E, Brufau J. 2010. Probiotic micro-organisms: 100 years of innovation and efficacy; modes of action. *World's Poultry Science Journal* **66**:369-380.
- Volzing K, Borrero J, Sadowsky MJ, Kaznessis YN. 2013. Antimicrobial Peptides Targeting Gram-negative Pathogens, Produced and Delivered by Lactic Acid Bacteria. *ACS Synthetic Biology* **2**:643-650.
- Walter J, Ley R. 2011. The Human Gut Microbiome: Ecology and Recent Evolutionary Changes. *Annual Review of Microbiology* **65**:411-429.
- Wang BH, Yao MF, Lv LX, Ling ZX, Li LJ. 2017a. The Human Microbiota in Health and Disease. *Engineering* **3**:71-82.
- Wang R, Jiang L, Zhang M, Zhao L, Hao Y, Guo H, Sang Y, Zhang H, Ren F. 2017b. The Adhesion of *Lactobacillus salivarius* REN to a Human Intestinal Epithelial Cell Line Requires S-layer Proteins. *Scientific Reports* **7**:44029.
- Wells JM, et al. 2016. Homeostasis of the gut barrier and potential biomarkers. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **312**:G171-G193.
- West NP, et al. 2013. Butyrylated starch increases colonic butyrate concentration but has limited effects on immunity in healthy physically active individuals. *Exerc Immunol Rev* **19**:102-119.
- Wohlgemuth S, Loh G, Blaut M. 2010. Recent developments and perspectives in the investigation of probiotic effects. *International Journal of Medical Microbiology* **300**:3-10.
- Ximenez C, Torres J. 2017. Development of Microbiota in Infants and its Role in Maturation of Gut Mucosa and Immune System. *Archives of Medical Research* **48**:666-680.
- Yang X, Twitchell E, Li G, Wen K, Weiss M, Kocher J, Lei S, Ramesh A, Ryan EP, Yuan L. 2015. High protective efficacy of rice bran against human rotavirus diarrhea via enhancing probiotic growth, gut barrier function and innate immunity. *Scientific Reports* **5**:15004.
- Yang Y-J, Sheu B-S. 2012. Probiotics-Containing Yogurts Suppress *Helicobacter pylori* Load and Modify Immune Response and Intestinal Microbiota in the *Helicobacter pylori*-Infected Children. *Helicobacter* **17**:297-304.
- Yoon H, Park YS, Lee DH, Seo J-G, Shin CM, Kim N. 2015. Effect of administering a multi-species probiotic mixture on the changes in fecal microbiota and symptoms of irritable bowel

- syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* **advpub**.
- Yousefi B, Eslami M, Ghasemian A, Kokhaei P, Farrokhi AS, Darabi N. 2019. Probiotics importance and their immunomodulatory properties. *Journal of Cellular Physiology* **234**:8008-8018.
- Zhang B, Zuo F, Yu R, Zeng Z, Ma H, Chen S. 2015. Comparative genome-based identification of a cell wall-anchored protein from *Lactobacillus plantarum* increases adhesion of *Lactococcus lactis* to human epithelial cells. *Scientific Reports* **5**:14109.
- Zhang W, Wang H, Liu J, Zhao Y, Gao K, Zhang J. 2013. Adhesive ability means inhibition activities for *Lactobacillus* against pathogens and S-layer protein plays an important role in adhesion. *Anaerobe* **22**:97-103.
- Zhang Z, Lv J, Pan L, Zhang Y. 2018. Roles and applications of probiotic *Lactobacillus* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology* **102**:8135-8143.
- Zmora N, et al. 2018. Personalized Gut Mucosal Colonization Resistance to Empiric Probiotics Is Associated with Unique Host and Microbiome Features. *Cell* **174**:1388-1405.e1321.