

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



**Rostlinné džusy a fenolové látky z nich a jejich  
role na buňky střevního epithelu**

**Bakalářská práce**

**Autor práce: Alžběta Maryšková**

**Vedoucí práce: doc. Ing. Jaroslav Havlík, Ph.D.**

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Rostlinné džusy a fenolové látky z nich a jejich role na buňky střevního epithelu" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské 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 bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 11. 4. 2015

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou vyjádřila poděkování doc. Ing. Jaroslavu Havlíkovi, Ph.D. za jeho cenné rady a vstřícnost při vedení mé bakalářské práce. Rovněž bych chtěla velmi poděkovat Ing. Ivo Doskočilovi za trpělivost, ochotu a pomoc při zpracování této bakalářské práce. Velké poděkování náleží mé rodině nejen za kontrolu této práce, ale i za podporu, trpělivost a povzbuzování po dobu mého studia.

## Souhrn

Ovoce a zelenina, přítomná ve stravě, slouží jako hlavní zdroj rostlinných fenolových sloučenin, které mají prokázaný efekt při prevenci chorob, jako jsou arterioskleróza, obezita, rakovina, srdeční choroby, chronické záněty a mnoho dalších. Biologické vlastnosti rostlinných fenolových sloučenin závisí na biologické dostupnosti zejména ve střevním epitelu, kde je tato dostupnost ovlivňována hlavně střevní mikroflórou a to probiotickými kmeny *Lactobacillus spp.* a *Bifidobacterium* běžně přítomné ve střevní mikroflóře.

Pro hostitele mají probiotika pozitivní efekt a jsou schopny chránit organismus před patogeny a efektivně zabráňovat poškození střevní sliznice. U snadno adhezujících kmenů dochází k obsazení vazebných míst na střevním epitelu a zabránění patogenům adherovat na sliznici střevního epitelu.

*In vitro* buněčný model epitelu tlustého střeva, který je tvořený buněčnými liniemi kolorektálního karcinomu Caco-2 a HT29-MTX (absorpční a pohárkové buňky), simuluje sliznici střevního epitelu a poskytuje informace o adhezenci probiotických organismů.

Cílem práce bylo zjistit, jak za přítomnosti katechinu, epikatechinu, kyseliny chlorogenové a kvercetinu bude ovlivněna adherence kmene *Lactobacillus gasseri* na *in vitro* buněčném modelu. Výsledky ukazují, že přítomnost flavonoidů zvyšuje adhezenci *L. gasseri* u kvercetinu o 10,5 %, katechinu o 8,9 %, kyseliny chlorogenové o 8,8 % a epikatechinu o 8,3 %.

### **Klíčová slova:**

*Lactobacillus*, flavonoidy, *in vitro*, adherence, buněčné linie, Caco-2, HT29-MTX

## Summary

Fruit and vegetables contained in the diet serve as the main source of the plant phenolic compounds which have a proven effect in preventing the diseases such as arteriosclerosis, obesity, cancer, heart diseases, chronic inflammation, and many others. Biological properties of the plant phenolic compounds depend on the bioavailability particularly in the intestinal epithelium, which is mainly influenced by the availability of the intestinal microflora and the probiotic strains of *Lactobacillus spp.* and *Bifidobacterium* normally present in the intestinal microflora.

Probiotics have a positive effect for a host and they are able to protect the organism against pathogens and effectively prevent the damage to the intestinal mucosa. Occupancy of binding sites on the intestinal epithelium and preventing pathogens to adhere to the mucosa of the intestinal epithelium occur in the easily adhering strains.

In vitro cellular model of the intestinal epithelium of the colon, which is composed of the colorectal cancer cell lines Caco-2 and HT29-MTX (absorptive and goblet cells) simulates the intestinal epithelial mucosa and provides information on the adherence of the probiotic organisms.

The aim of the study was to determine how the presence of catechin, epicatechin, chlorogenic acid and quercetin will affect adherence of *Lactobacillus gasseri* on *in vitro* cellular model. The results show that the presence of flavonoids increases the adherence of *L. gasseri* quercetin at 10.5 %, 8.9 % catechin, chlorogenic acid 8.8 % and 8.3 % epicatechin.

## Keywords:

*Lactobacillus*, flavonoids, *in vitro*, adhesion, cell line, Caco-2, HT29-MTX

# Obsah

1. Úvod.....	3
2. Cíl práce .....	4
3. Literární přehled.....	5
3.1. Mikrobiom lidského trávicího traktu.....	5
3.1.1. Patogenní bakterie s negativním účinkem na hostitele.....	6
3.1.2. Probiotické bakterie s pozitivním efektem pro hostitele.....	7
3.1.3. Role probiotických mikroorganismů .....	8
3.1.4. Role probiotik v modulaci imunitního systému.....	9
3.1.5. Změny mikrobiomu v souvislosti s výživou a životním stylem .....	11
3.2. Mechanismy mikrobiální adherence na střevní stěnu .....	12
3.2.1. Význam adherence .....	12
3.2.2. Mechanismus adherence .....	14
3.3. <i>In vitro</i> testy mikrobiální adherence.....	14
3.3.1. Autoagregace vs. adherence.....	14
3.3.2. Adherence na mucin a slizniční buňky .....	15
3.3.3. Adherence na buněčné linie Caco-2, HT-29 a HT29-MTX.....	16
3.3.3.1. Caco-2 .....	16
3.3.3.2. HT-29 a HT29-MTX.....	18
3.4. Rostlinné fenolové sloučeniny přítomné ve stravě.....	19
3.4.1. Fenolové kyseliny .....	21
3.4.2. Flavonoidy a flavonoidní glykosidy .....	22
3.4.3. Antioxidanty - jejich mechanismy a biodostupnost.....	28
4. Metodika a materiál.....	32
4.1. Materiál .....	32
4.2. Metodika.....	32

4.2.1.	Kultiva buněčné ko-kultury Caco-2 a HT29-MTX.....	32
4.2.2.	Založení 24-jamkové destičky .....	33
4.2.3.	Izolace laktobacilů .....	33
4.2.4.	Test adherence.....	33
4.2.5.	Statistické vyhodnocení .....	34
5.	Výsledky .....	35
6.	Diskuze.....	37
7.	Závěr .....	44
8.	Použitá literatura .....	45
9.	Seznam použitých zkratk.....	63
10.	Seznam použitých obrázků, tabulek a grafů .....	64

# 1. Úvod

Probiotické organismy jsou nedílnou součástí mikrobiomu, který je přítomný v trávicím traktu. Zejména kmeny rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacteria* se běžně vyskytují v lidském střevě, kde mají pozitivní vliv na hostitele. Probiotika jsou schopné zabraňovat patogenním organismům v adherenci na kartáčový lem střevního epitelu. A tím podporovat střevní imunitu a zdraví hostitele (Williams, 2010).

V současné době je věnován zájem potravinám a jejich vlivu na adherenci střevního epitelu. Složkou potravin ovlivňující adherenci jsou nejen probiotické organismy, ale i rostlinné fenolové sloučeniny. Největším zdrojem těchto látek v lidské stravě je ovoce a zelenina. V nich obsažené fenolové sloučeniny mají pozitivní přínos pro lidské zdraví, díky své antioxidační aktivitě *in vivo* i *in vitro* podmínkách. Jejich dostatečný příjem může zabránit vzniku mnoha nemocem, jako je rakovina, chronický zánět, obezita, mrtvice, ischemická srdeční nemoc a jiné (Naczk and Shahidi, 2004).

Účinky antioxidantů však nezávisí jen na koncentraci v ovoci a zelenině, ale i na její biologické dostupnosti. Různé látky jsou nejlépe biologicky dostupné v různých částech trávicího traktu, kde jsou ovlivňovány probiotickými organismy a naopak (Saura-Calixto et al., 2007).



## 2. Cíl práce

Cílem práce je ověření, zda a do jaké míry ovlivňují fenolové sloučeniny a extrakty z ovoce a zeleniny adherenci laktobacilů *in vitro* na buněčném modelu střevního epitelu. Testovanou hypotézou je, že extrakty pozitivně, či negativně adherenci ovlivňují a tento jev je druhově specifický.

### 3. Literární přehled

#### 3.1. Mikrobiom lidského trávicího traktu

Mikroflóra dospělého člověka obsahuje  $10^{14}$  mikroorganismů, což je více než je buněk v lidském organismu. Mikroflóra zahrnuje přes 500 druhů mikroorganismů a k nejdůležitějším rodům patří *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* a *Escherichia* (Saunier, Dore, 2002). Tyto mikroorganismy trávicího traktu člověka tvoří komplexní ekosystém, který má vliv na lidské zdraví. Napomáhá vývoji imunitního systému a zabraňuje kolonizaci patogeny způsobující alergie, zánětlivá onemocnění střev nebo metabolická degenerativní onemocnění (Marteau and Salminen, 1997). Jednou ze základních schopností tohoto systému u zdravého člověka je udržení kvantitativní a kvalitativní rovnováhy souboru mikroorganismů, které jsou přítomné v trávicím traktu (Švestka, 2007).

Bifidobakterie, které jsou součástí lidské mikroflóry se využívají také ve farmaceutickém průmyslu v podobě probiotik. Probiotika jsou živé mikroorganismy, které pozitivně ovlivňují a chrání organismus hostitele před patogeny a ochraňují střevní sliznici (Senok et al., 2005). Příznivý vliv na zdraví hostitele a lepší činnost jeho gastrointestinální mikroflóry mají i prebiotika. Prebiotika jsou selektivně fermentované složky potravy, které umožňují specifické změny ve složení a činnosti střevní mikroflóry. Obecně jsou mezi ně řazeny nestravitelné oligosacharidy, zejména fruktooligosacharidy (Pharmaceutiques, 1995). Kombinací probiotik (živé mikrobiální doplňky) a prebiotik (vhodný substrát) dosáhneme synergického účinku. Tuto kombinaci nazýváme symbiotika (Collins and Gibson, 1999). Symbiotika podporují růst stávajících probiotických bakterií v tlustém střevě a pozitivně působí na setrvání a růst nových kmenů (Liong, 2008). Symbiotická kombinace inulinu a oligofruktózy s *Lactobacillus plantarum* a *Lactobacillus bifidum* zvyšuje růst bifidobakterií a potlačuje pro člověka patogenní kmeny, jako jsou *Campylobacter jejuni*, *E. coli* a *Salmonella enteritidis in vitro*. Jiné testované sacharidy nebyly tak účinné (De Vrese and Marteau, 2007). Příkladem symbiotik mohou být fruktooligosacharidy ve spojení s bifidobakteriálním kmenem nebo laktitol v kombinaci s laktobacily (Collins and Gibson, 1999).

### 3.1.1. Patogenní bakterie s negativním účinkem na hostitele

#### *Streptococcus*

*Streptococcus* jsou grampozitivní bakterie mléčného kvašení kulovitého tvaru. V gastrointestinálním traktu člověka patří mezi fakultativně anaerobní druhy. Vyskytují se jako přirození komenzálové na kůži, v dutině ústní a nosohltanu, v horních cestách dýchacích, trávicím a urogenitálním traktu člověka i zvířat. Patogenní druhy *Streptococcus* mohou způsobit bolesti v krku, zápal plic, meningitidu nebo endokarditidu (Juneja and Sofos, 2010, Brittan and Nobbs).

#### *Clostridium*

*Clostridium* jsou anaerobní sporotvorné tyčinkovité bakterie, které jsou využívány v lékařství a průmyslové mikrobiologii. Jsou důležitou součástí kvasných procesů u výroby rozpouštědel a organických kyselin. Mohou způsobit různá onemocnění jak u lidí, tak u zvířat. Mezi hlavní faktory virulence patří enzymy a toxiny, které vyvolávají nemoce, jako jsou např.: botulismus, tetanus, sněť a rané záněty (Johnson, 2009). *Clostridium difficile* je běžná součást střevní mikroflóry. Při používání antibiotik však může dojít k jejich přemnožení, doprovázené zvýšenou produkcí toxinů, které mohou poškodit výstelku střeva a následně je možný výskyt bolesti v břišní dutině doprovázené vodnatými průjmy (Votava, 2003).

#### *Escherichia coli*

*Escherichia coli* je gramnegativní anaerobní tyčinkovitá bakterie, která je 2–3 µm dlouhá a 0,6 µm široká. Barví se homogenně. Na povrchu má různé typy fibríí, které umožňují adhezi na hostitelskou buňku. *Escherichia coli* je komenzálem tlustého střeva a je používána jako indikátor fekální kontaminace pitné vody. Patogenní *E. coli* může způsobit infekci v intestinálním traktu vyvolávající průjmy nebo extraintestinální onemocnění, kde infikuje močové cesty (Bednář, 1996). Druhy *Bacteroides* tvoří spory, ale tzv. kapsle. Jejich buněčná membrána neobsahuje endotoxin, proto je jejich patogenita omezená. Nejčastěji je spojována s infekcí dutiny břišní, zánětem pobříšnice a appendixu. V tlustém střevě člověka a zvířat se nachází bakterie *Bacteroides fragilis*, které tvoří 1–2 % z celkového objemu střevní bakteriální mikroflóry (Hentges, 2012).

### 3.1.2. Probiotické bakterie s pozitivním efektem pro hostitele

Do kmene *Actinobacteria* patří rod *Bifidobacterium*, kde jsou grampozitivní, nesporulující, nepohyblivé anaerobní tyčinky. Bifidobakterie se nalézají v mateřském mléce (Makino et al., 2015), dutině ústní (Aas et al., 2005), tlustém střevě (Koutsos et al., 2014) nebo pochvě žen (Chaban et al., 2014).

V trávicím traktu kojenců převládá kmen bifidobakterií, které získávají z mateřského mléka. S věkem se mikroflóra člověka mění. Počet bifidobakterií se s rostoucím věkem jedince postupně snižuje a nakonec se stane až třetím nejpočetnějším rodem (cca 25 % z celkového počtu bakterií střevní mikroflóry dospělého jedince) po rodu *Bacteroides* a *Eubacterium*. *B. infantis* a *B. breve* jsou typické pro děti, zatímco u dospělých je nahrazuje *B. adolescentis*. *B. longum* přetrvává po celý život člověka (Hentges, 2012).

I v dospělém věku hrají bifidobakterie důležitou roli v mikroflóře tlustého střeva při regulaci pH pomocí kyseliny mléčné a octové, které brání rozmnožování a růstu patogenů. Z tohoto důvodu se bifidobakterie využívají v potravinářském průmyslu jako živé kultury pro mléčné výrobky nebo farmaceutické preparáty (Zavaglia et al., 2000), jako jsou probiotika, která zlepšují střevní mikroflóru. Výsledky studie podporují použití kmenů *B. longum* jako doplněk do mléčných výrobků, kdy *B. adolescentis* a *B. infantis* mohou být vhodnými alternativami. Každý kmen v rámci těchto druhů vykazuje jedinečné vlastnosti: tempo růstu, rychlost metabolismu, proteolytické aktivity a chuť (Martin, 1996).

Mezi další skupinu bakterií mléčného kvašení využívaných jako probiotika patří rod *Lactobacillus*. Jsou to grampozitivní anaerobní bakterie, které rozkládají laktózu a další cukry na kyselinu mléčnou. V těle člověka se nachází hlavně v dutině ústní a gastrointestinálním traktu. Používají se v potravinářském průmyslu při výrobě fermentovaných produktů, jako jsou například: jogurty, sýry, kyselé zelí, cidery, vína (Pot, 2008). Studie prokázaly, že rod *Lactobacillus* má preventivní účinky před zánětlivým onemocněním střev (Ouwehand et al., 2002, Mohamadzadeh et al., 2005). Rod *Lactobacillus* má několik specifických kmenů. *Lactobacillus gasseri* kolonizuje gastrointestinální trakt, dutinu ústní a pochvy žen (Boot et al., 1996). *Lactobacillus acidophilus* je využívám jako probiotikum už více jak 40 let. Je to často konzumovaný probiotický mikroorganismus, který prošel dvojitě zaslepenými, randomizovanými a placebem kontrolovanými klinickými studiemi. Tyto studie prokázaly, že *L. acidophilus* je bezpečný a má pozitivní vliv na lidské zdraví. Zmírňuje příznaky virové infekce, zlepšuje funkci střev a snižuje množství Clostridií (Lahtinen et al., 2012, Ringel-

Kulka et al., 2011). Probiotická aktivita *L. acidophilus* je závislá na přežití při průchodu gastrointestinálním traktem a dočasné dominanci mikroflóry tenkého střeva, kde přilnavost probiotických mikroorganismů k hostitelskému epitelu usnadňuje odlišná genová exprese a imunomodulace (Booijink et al., 2007).

**Tab. 1:** Složení gastrointestinálního traktu dospělého člověka

	Počet mikroorganismů CFU/ml nebo CFU/g			
	ŽALUDEK	LAČNÍK	KYČELNÍK	TLUSTÉ STŘEVO
Celkový počet	0–10 <sup>3</sup>	0–10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup> –10 <sup>9</sup>	10 <sup>10</sup> –10 <sup>12</sup>
AEROBNĚ ROSTOUCÍ				
<i>Enterobacteriaceae</i>	0–10 <sup>2</sup>	0–10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup> –10 <sup>7</sup>	10 <sup>4</sup> –10 <sup>10</sup>
<i>Streptococci</i>	0–10 <sup>3</sup>	0–10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup> –10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup> –10 <sup>10</sup>
<i>Staphylococci</i>	0–10 <sup>2</sup>	0–10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup> –10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup> –10 <sup>9</sup>
<i>Lactobacilli</i>	0–10 <sup>3</sup>	0–10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup> –10 <sup>3</sup>	10 <sup>6</sup> –10 <sup>10</sup>
Kvasinky	0–10 <sup>3</sup>	0–10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup> –10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup> –10 <sup>6</sup>
ANAEROBNÍ BAKTERIE				
<i>Bacteroides</i>	vzácně	0–10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup> –10 <sup>7</sup>	10 <sup>10</sup> –10 <sup>12</sup>
<i>Bifidobacteria</i>	vzácně	0–10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup> –10 <sup>9</sup>	10 <sup>4</sup> –10 <sup>11</sup>
<i>Peptostreptococci</i>	vzácně	0–10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup> –10 <sup>6</sup>	10 <sup>10</sup> –10 <sup>12</sup>
<i>Clostridia</i>	vzácně	vzácně	10 <sup>2</sup> –10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup> –10 <sup>11</sup>
<i>Eubacteria</i>	vzácně	vzácně	Vzácně	10 <sup>10</sup> –10 <sup>12</sup>

(Lata et al., 2009)

### 3.1.3. Role probiotických mikroorganismů

Střevní mikrobiom je tvořen až ze 40 000 kmenů aerobních a anaerobních bakterií, virů, hub a dalších mikroorganismů. Složení mikroflóry gastrointestinálního traktu je v každé části střeva jiné (tab. 1). Všechny tyto mikroorganismy chrání společně s imunitním systémem organismus hostitele (Lata et al., 2009). Nejdůležitější součástí střevního mikrobiomu jsou probiotika - živé nepatogenní organismy, které zlepšují mikrobiální rovnováhu v gastrointestinálním traktu. Jejich blahodárné účinky jsou způsobeny několika různými mechanismy: snižují pH ve střevech, omezují růst a šíření patogenních organismů a jsou základem pro dobrou imunitu člověka (Williams, 2010).

Vyčerpání mikrobiální flóry (především probiotik) může u člověka způsobit náchylnost k infekci enteropatogenními bakteriemi, jako je *Salmonella*, *Shigella*, enterotoxigenní *E. coli* nebo *Vibrio cholerae* (De Vrese and Marteau, 2007). K opětovnému doplnění mikrobiální flóry jsou podávány potravinové doplňky obsahující probiotické bakterie, které však musí být schopné překonat některé biologické překážky. Mezi hlavní bariéry patří kyselina chlorovodíková v žaludku nebo žluč v tenkém střevě. Kmeny bakterií použité v potravinových doplňcích musí rovněž prokázat v každém výrobku svou bezpečnost, účinnost a dostatečné množství životaschopných mikroorganismů po celou dobu použitelnosti (Chen et al., 2014). Konzumací probiotik může docházet ke snížení rizika gastrointestinální a urogenitální infekce, alergie a některých střevních poruch, jelikož dokáží inhibovat růst, adhezi na střevní buňky a metabolickou aktivitu enteropatogenních bakterií (De Vrese and Marteau, 2007). Díky těmto vlastnostem mohou probiotika zabraňovat průjmům při léčbě antibiotiky (Johnston et al., 2011). Z tohoto důvodu je vhodné užívat probiotika alespoň dvě hodiny před dávkou antibiotik (Williams, 2010). Na trhu je k dostání mnoho produktů s obsahem probiotik, jako jsou například: výživové doplňky ve formě kapek a kapslí nebo acidofilní mléka (Chen et al., 2014).

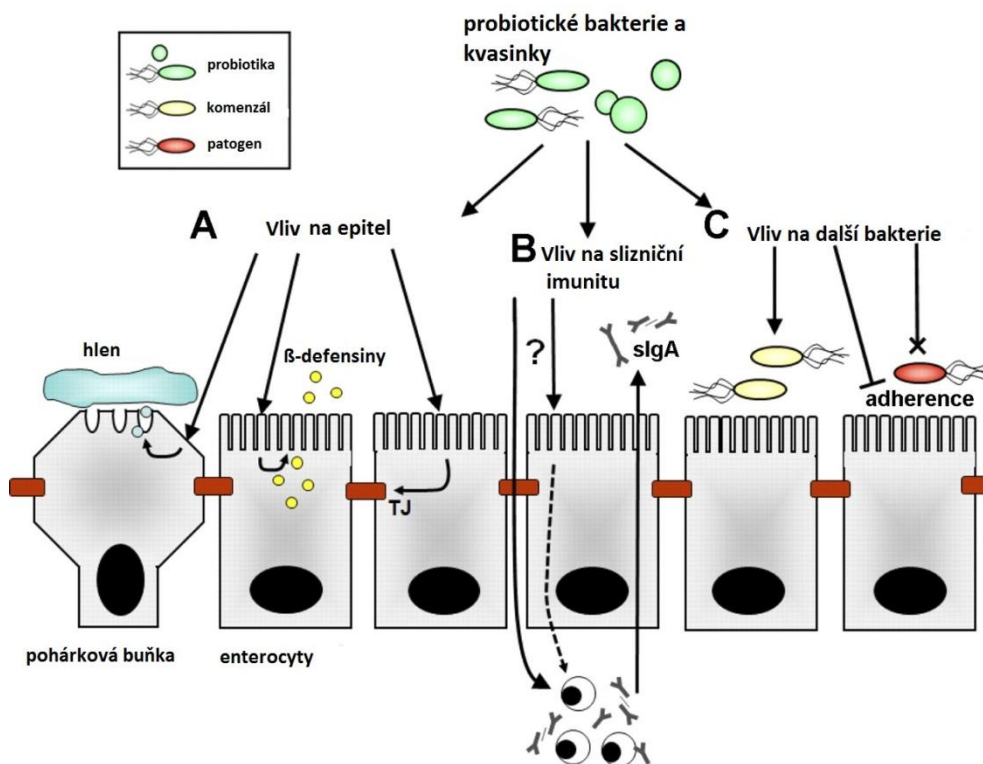
#### **3.1.4. Role probiotik v modulaci imunitního systému**

Imunita je stimulovaná střevním epitelem, který působí na slizniční bariéru. Sliznice člověka má povrch kolem 300 m<sup>2</sup> a je nejdůležitějším místem kontaktu mezi mikroorganismy a vnějším prostředím. Imunitní systém sliznic má bariérovou funkci, která chrání člověka před infekcemi a patogenními organismy (Tlaskalová-Hogenová et al., 2002). Enterocyty se nacházejí v tenkém a tlustém střevu, kde produkují antimikrobiální peptidy, které reagují na grampozitivní a gramnegativní bakterie, houby i kvasinky. Intestinální epiteliální bariéra inhibuje bakteriální adhezi, neutralizuje viry a toxiny. Dokáže odstranit i některé antigeny, které navozují systémovou zánětlivou reakci (Yu et al., 2012).

Mikroflóra střev má nejvýznamnější funkci během postnatálního období, kdy se vyvíjí lokální i systémová imunita. Časem se mechanismy změny a začnou udržovat systémovou a slizniční imunitu v rovnováze (Kokešová, 2009). Podporu mechanismů gastrointestinálního traktu zajišťují probiotické bakterie, které regulují imunitu prostřednictvím kontroly bilance prozánětlivých a protizánětlivých cytosinů. Dokáží zmírnit záněty střev, napravit střevní slizniční dysfunkci a regulovat střevní přecitlivělost (Isolauri et al., 2001).

Probiotika ovlivňují bariérní funkci střevního epitelu několika způsoby v závislosti na kmenu bakterií nebo kvasinek (obr. 1). Prvním ze způsobů je přímý účinek na epitel. Probiotika mohou zvýšit sekreci pohárkových buněk a koncentraci mucinu, který vytvoří hlen, tím se bakteriím omezí cesta přes slizniční vrstvy (Ouwehand et al., 2002).  $\beta$ -defensiny ničí mnoho gramnegativních a grampozitivních bakterií. Druhý způsob je vliv na slizniční imunitu. Protilátka třídy imunoglobulinu A (IgA) je produkována v buňkách lamina propria a podporuje sekreční IgA (Isolauri et al., 2001). Navazuje na sebe bakterie a jejich antigeny, a tím zamezuje bakteriální kolonizaci na epitelu. Poslední způsob je vliv na infikované bakterie. Probiotika mohou eliminovat nebo inhibovat růst patogenních bakterií pomocí exprese antimikrobiálních faktorů (Ohland and MacNaughton, 2010, Isolauri et al., 2001, Chen et al., 2014).

**Obr. 1:** Vliv probiotických bakterií a kvasinek na bariérní funkci střevního epitelu



Upraveno podle Ohland and MacNaughton (2010)

### 3.1.5. Změny mikrobiomu v souvislosti s výživou a životním stylem

Mikrobiom člověka je zkoumán hned z několika důvodů: má vliv na fyziologii člověka, významně se podílí na růstu lidských střevních buněk, pomáhá udržovat jejich homeostázu a může být příčinou různých onemocnění, jako je zánětlivé onemocnění střev nebo obezita (Hattori and Taylor, 2009).

Studii, kterou vypracovali Hildebrandt et al. (2009) předložila údaje o tom, jak vysoký obsah tuku ve stravě může ovlivnit mikroflóru myších střev nezávisle na obezitě. Byl vyzorován pokles bakterií z kmene *Bacteroidetes* a zvýšení bakterií z kmene *Firmicutes* a *Proteobacteria*. Turnbaugh et al. (2009) střídavě krmili myši stravou s nízkým obsahem tuku, stravou s rostlinnými polysacharidy s vysokým obsahem tuku a s vysokým obsahem cukru. Bylo zjištěno, že změnou stravy se mikroflóra střev změnila již za jediný den. Wu et al. (2011) ve své studii posuzují vliv stravy s vysokým obsahem vlákniny na mikrobiom, kde výsledkem bylo zvýšení počtu bakterií z kmene *Bacteroidetes* a *Actinobacteria* a pokles bakterií z kmene *Firmicutes* a *Proteobacteria*. Fekální vzorky vegetariánů a veganů byly porovnávány se vzorky lidí, kteří jedí kompletní a pestrou stravu bez omezení. Při dlouhodobé dietě byla ovlivněna mikroflóra střev. Počet bakterií z kmene *Bacteroides* poklesl spolu s *Enterobacteriaceae*, *Bifidobacterium* a *E. coli* (tab. 2) (Zimmer et al., 2011).

**Tab. 2:** Vliv výživy na střevní mikroflóru

Dietní intervence	Změny mikrobiomu	Reference
Vysokotučná dieta	Bacteroidetes↓ Firmicutes ↑ Proteobacteria↑	(Hildebrandt et al., 2009)
Vysokotučná/ vysokosacharidová dieta	Bacteroidetes↓ Firmicutes ↑ (Erysipelotrichi, Bacilli)	(Turnbaugh et al., 2009)
Strava s vysokým obsahem vlákniny	Bacteroidetes↑, Actinobacteria↑ Firmicutes↓, Proteobacteria↓	(Wu et al., 2011)
Vegetariánská strava	Bacteroides spp.↓, Enterobacteriaceae spp.↓ <i>Bifidobacterium</i> spp.↓, <i>Escherichia coli</i> ↓	(Zimmer et al., 2011)



## **3.2. Mechanismy mikrobiální adherence na střevní stěnu**

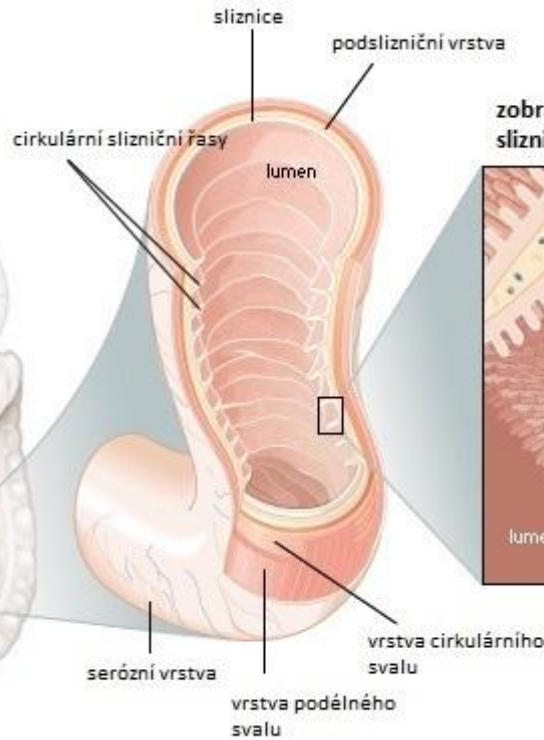
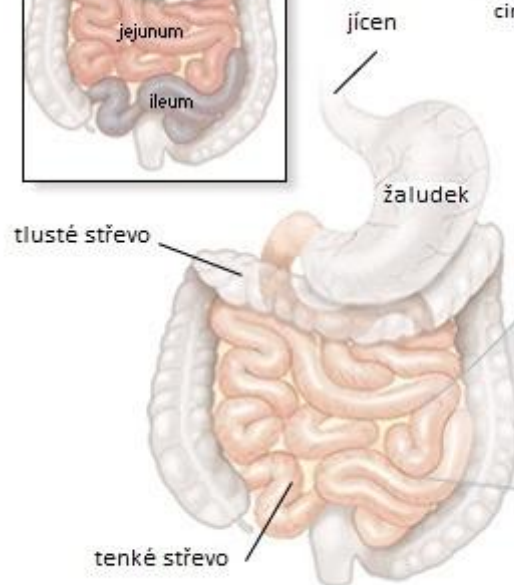
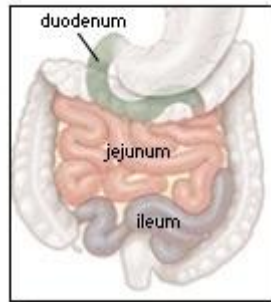
### **3.2.1. Význam adherence**

Trávicí trakt má na svém povrchu sliznici (obr. 2), která ho chrání vrstvou hlenu a bakteriemi střevní mikroflóry. Hlenová vrstva je důležité místo pro adhezi a kolonizaci bakterií, protože je první kontaktní plochou mikroorganismů po vstupu do střeva (Ouwehand et al., 2001). Adheze udržuje mikroorganismy v těle, aby nebyly odstraněny pohyby obsahu trávicího traktu. Patogeny, které do organismu vstupují s potravou nebo kontaminovanou vodou, pronikají vrstvou hlenu pomocí bičíku, změnou svého tvaru nebo enzymů. To vede k bakteriální infekci a zahájení infekčního onemocnění (Bednář, 1996). Laktobacily a bifidobakterie dokáží inhibovat uchycení patogenních bakterií na jejich vazebná místa na kartáčovém lemu střevního epitelu (Bernet et al., 1994). Každý mikroorganismus preferuje pro adhezi jiné místo, které se může lišit u jednotlivých druhů hostitelů. Místa rozdělujeme na:

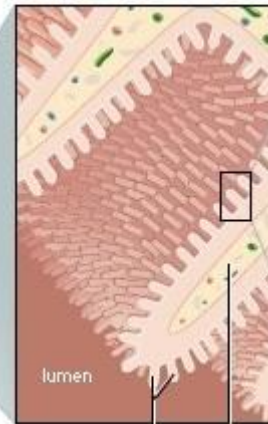
- 1) povrch epiteliálních buněk
- 2) krypty v ileu, slepém a tlustém střevě
- 3) gelovitý hlen pokrývající epitel
- 4) lumen střeva (Schrezenmeir and de Vrese, 2001).

**Obr. 2:** Tenké střevo a jeho absorpce

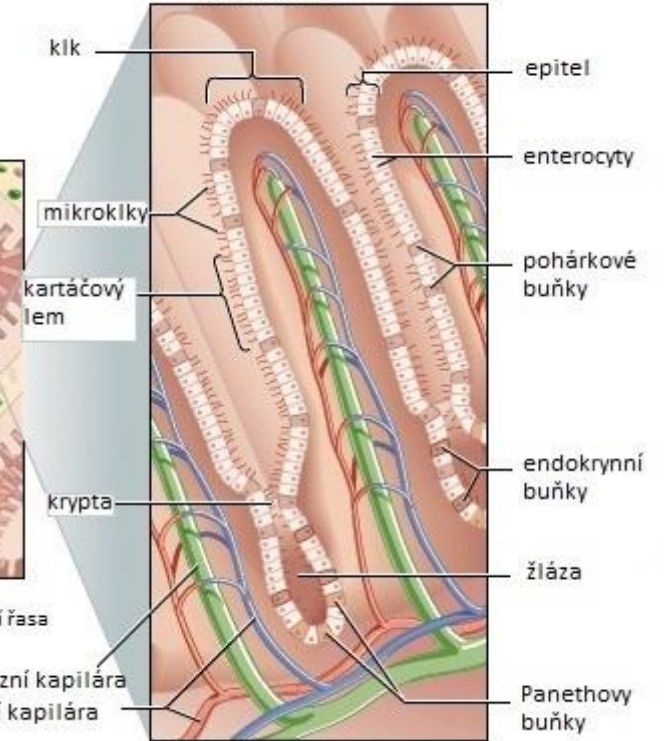
**oblasti tenkého střeva**



**zobrazení cirkulární slizniční řasy**



**stavba klků**



### 3.2.2. Mechanismus adherence

Adherence spočívá v tom, že na povrchu mikroorganismu se vyskytují adheziny (proteiny), které interagují s receptory na epitelové buňce (glykoproteiny, glykolipidy) (Capaldo et al., 2014). Fibroblasty produkují glykoprotein fibronektin, který je důležitý při vazbě mikroorganismů na eukaryotické buňky. Fibronektin zajišťuje vazbu zejména grampozitivních koků a některých virů na epitel. Adherence je důležitá pro množení mikroorganismů v místě infekce (Bednář, 1996). Schopnost probiotik adherovat na střevní sliznici může prodloužit dobu jejich působení v trávicím traktu (Ouwehand et al., 2001), tím je podpořeno vylučování patogenů a jejich interakce s buňkami epiteliálního imunitního systému hostitele (Jensen et al., 2012). Bakterie, které adherují jen na hlen a nikoli na epitel střevní sliznice mohou být s degradovanými muciny vyplaveny trávicím traktem (Buck et al., 2005).

Adheze laktobacilů a bifidobakterií na lidské epiteliální buňky Caco-2 závisí nejen na fyziologii bakterií nebo jejich fyzikálně-chemických parametrech, ale také na výskytu kyseliny lipoproteinové, která funguje jako mediátor adheze *Lactobacillus* spp. a jiných bakterií (Granato et al., 1999). Adheze bakterií na střevní epitel je multifaktoriální jev, který zahrnuje elektrostatické interakce, hydrofobní reakce nebo specifickou bakteriální strukturu (Jensen et al., 2012).

### 3.3. In vitro testy mikrobiální adherence

#### 3.3.1. Autoagregace vs. adherence

Autoagregace je adherence bakterií stejného kmene a má důležitý význam v lidském střevě (Jankovic et al., 2003). Del Re et al. (2000) prokázali, že autoagregace úzce souvisí s adherencí. U všech kmenů *Bifidobacterium longum*, které nebyly schopné autoagregace není možná adherence na buňky Caco-2. Ale pokud kmeny *B. longum*, které jsou schopné autoagregace působí současně s kmeny, které autoagregace schopné nejsou, pak je možná adherence na Caco-2 buňky u obou kmenů. Kmen *B. longum* 8 nebyl schopen adheze, jelikož je málo hydrofobní (neinteragující s vodou). Měřením mikrobiální adheze na uhlovodíky bylo zjištěno, že autoagregace a hydrofóbnost jsou dvě nezávislé schopnosti bakterií, které jsou nezbytné k adhezi. Díky těmto schopnostem by bylo možné předběžně

identifikovat bakterie a to využít ke komerčním účelům. Obecně platí, že probiotické kmeny vykazují vyšší autoagregační schopnosti než kmeny patogenů (Collado et al., 2007).

### **3.3.2. Adherence na mucin a slizniční buňky**

Aby mohla probiotika adherovat na střevní epitel, je nezbytná přítomnost mucinu (složitý glykoprotein), který chrání střevní plochy sliznic hostitele před škodlivými antigeny a podporuje motilitu lumenu střeva (Mack et al., 2003, Van Tassell and Miller, 2011). Muciny tvoří vrstvu hlenu, která je první fyzickou bariérou proti bakteriím ve střevě. Adheze tohoto hlenu je nutná pro interakci probiotických organismů s hostitelskými buňkami. Vrstva hlenu v lidském intestinálním traktu má výšku 30–300  $\mu\text{m}$ . Čím je od tenkého střeva blíže ke konečníku, tím je tloušťka hlenu větší (Van Tassell and Miller, 2011).

Mucin sekretují cylindrické pohárkové buňky, které jsou rozmístěné mezi epitelovými buňkami. V rozšířených částech pohárku se nachází mucigenní zrna, která jsou tvořená převážně glykoproteiny – mucinem. Odtud je mucin sekretován do střeva, kde na jeho povrchu vytváří hydrofilní membránu. Přechodem do tlustého střeva se počet pohárkových buněk zvyšuje. V tlustém střevě je poměr enterocytů k pohárkovým buňkám 2:1 (Grajek and Olejnik, 2004).

Muciny můžeme rozlišit na sekreční a membránové. V tracheobronchiální, gastrointestinální a reprodukční soustavě se nachází sekreční mucin, který zde tvoří hlen. Tento gelovitý hlen vzniká spojením disulfidových vazeb velkých oligomerů a proteinových monomerů (Gendler and Spicer, 1995). Hlen obsahuje mnoho proteinů, které se zúčastňují trávení a transportu živin do organismu (Grajek and Olejnik, 2004).

Zatím bylo nalezeno 20 různých typů mucinů (Atuma et al., 2001). V gastrointestinálním traktu se nachází hlavně muciny označené jako MUC2 a MUC3 (Gum Jr, 1995). Oba proteiny mají podobné receptory v podobných koncentracích. To potvrzuje i velmi silná korelace mezi adhezí k oběma typům hlenu (Ouwehand et al., 2001). MUC2 se skládá ze dvou vrstev, které mají různé vlastnosti a funkce. Vnitřní vrstva, přiléhající k epitelu střeva se skládá z malých pórů, které nedovolují přímému kontaktu s epitelálními buňkami. Vnější vrstva vzniká chemickými a fyzikálními procesy. Má menší hustotu a obsahuje větší počet bakterií, pro které má ideální prostředí. Tato vrstva je pro bakterie důležitým zdrojem energie a umožňuje jim se vázat na různá místa (Atuma et al., 2001).

Muciny obsahují vazebná místa pro rezidentní mikroflóru a zajišťují vysoké koncentrace imunoglobulinu, čím brání napadání a kolonizaci patogenních mikroorganismů. Obsahují oligosacharidy, které svou strukturou připomínají epiteliální receptory, na které naváží patogenní bakterie, a tím je imobilizují. Muciny jsou také spojovány s proliferací, diferenciací a karcinogenezí. Mají vliv na vývoj nádorů a jejich invazi (Leteurtre et al., 2004). Laktobacily a bifidobakterie dokáží inhibovat patogenní organismy na střevním epitelu. Aby tato účinnost mohla proběhnout, tak probiotika musí být schopna adheze na mucin nebo lidské epiteliální buňky. Testování adheze *in vitro* u potencionálních probiotik je doporučeno Organizací pro výživu a zemědělství (FAO - Food and Agriculture Organization) a Světovou zdravotní organizací (WHO – World Health Organization) (González-Rodríguez et al., 2012). Vybrané probiotické druhy *Lactobacillus*, které mají schopnost adheze na střevní epitelové buňky, rychle vyvolávají expresi mucinu MUC3. Vyšší koncentrace MUC3 má schopnost inhibovat adhezi patogenů na epiteliální buňky (Mack et al., 2003).

### **3.3.3. Adherence na buněčné linie Caco-2, HT-29 a HT29-MTX**

Mechanismus, kterým laktobacily adherují na buňky lidského střevního epitelu můžeme zkoumat za pomoci kultivace buněčných linií izolovaných z trávicího traktu člověka. Normální buněčné linie mají tu nevýhodu, že izolované enterocyty mají omezenou životaschopnost a rozdíly mezi různými dárci enterocytů mohou vyvolat proměnlivé výsledky z bakteriální studie *in vitro*, proto jsou využívány buněčné linie kolorektálního karcinomu a samostatně nebo ve směsných kulturách, které mají schopnost simulovat střevní epitel *in vitro* (Chauvière et al., 1992).

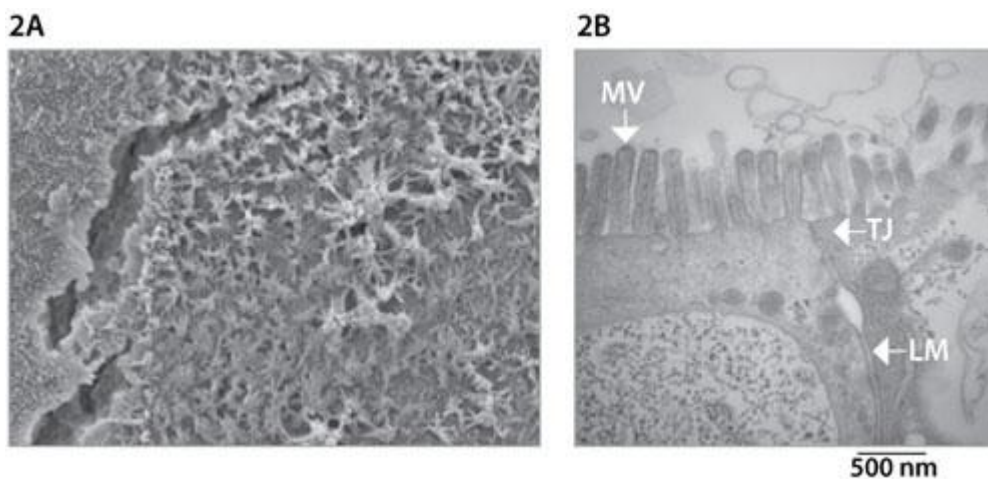
#### **3.3.3.1. Caco-2**

Caco-2 buňky tvoří heterogenní řadu buněk lidského epiteliálního kolorektálního karcinomu tlustého střeva. Tato buněčná linie je využívána k *in vitro* analýzám, případně k výzkumům zaměřených na zánětlivé procesy střevního epitelu (Sokol et al., 2008). Výhody buněčné linie Caco-2 jsou v morfologické i funkční rozličnosti, kdy jsou rozlišitelné na dvě části a to na apikální membránu a basolaterální membránu. Ty mezi sebou mají nepropustné spoje, a tím se podobají normálním epiteliálním buňkám (Simons and Fuller, 1985).

Za běžných podmínek kultivace se buněčná linie Caco-2 po 2–3 týdnech samovolně diferencuje do monovrstev polarizovaných buněk. Tato monovrstva je typická pro enterocyty. Po diferenciaci se vytvoří mikrokilky a následně tím může simulovat kartáčový lem střeva v *in vitro* testech (Grajek and Olejnik, 2004). Jádro enterocytů se nachází v bazální části a kartáčový lem zase v části apikální (obr. 3). Tato jádra obsahují velké množství mitochondrií (Gaillard et al., 1987, Yee, 1997). Díky této morfologii je buněčná linie Caco-2 využívána jako model linie enterocytů v pokročilých *in vitro* metodách a to konkrétně *in cellulo* testech při stanovování cytotoxicity látek, metabolismu látek, adherence mikroorganismů a dalších (Grajek and Olejnik, 2004, Artursson and Karlsson, 1991).

Výzkum, který uskutečnili Chauvière et al. (1992) prokázal, že schopnost laktobacilů adherovat na buněčnou linii Caco-2 se liší mezi kmeny. Výsledky ukázaly, že sedm z pětadvaceti kmenů *Lactobacillus* dobře adherují na monovrstvu Caco-2 buněk. Tato schopnost závisí na množství kationtů, které tvoří iontové můstky mezi povrchem bakterií a epitelovou buňkou. Kleeman a Klaenhammer (1982) zjistili, že nejlepší adhezi laktobacilů ke střevním buňkám způsobují dvojmocné kationty vápníku.

**Obr. 3:** Caco-2 buňky



2A – Snímek z rastrovacího elektronového mikroskopu – tvorba mikrokilků na buňkách Caco-2;

2B – Transmisní elektronová mikrofotografie Caco-2 buňky

(MV – mikrokilky, TJ – těsný spoj, LM – laterální membrána)

Zdroj: [www.sigmaladrich.com](http://www.sigmaladrich.com)

### 3.3.3.2. HT-29 a HT29-MTX

Schopnost laktobacilů adherovat na sliznici střeva je rozhodující podmínkou pro pozitivní efekt účinků probiotik, jelikož prodlužuje perzistenci ve střevě, a tím umožňuje uplatnit své zdraví prospěšné účinky (Collins et al., 1998). Byly studovány různé rody laktobacilů na eukaryotických buněčných liniích v rámci *in cellulo* metod, ve kterých dochází k simulaci lidské střevní sliznice (Wang et al., 2008). Mezi takové buněčné linie patří HT-29 izolovaná z tkáně kolorektálního karcinomu tlustého střeva 44leté ženy kavkazského původu. Jeho morfologie v *in cellulo* kulturách je typická pro epitelové buňky. Na rozdíl od buněčné linie Caco-2 však nedochází k vytvoření kartáčového lemu. Buněčná linie HT-29 je tvořena mikroklky, filamenty, silně vakuolizovanými mitochondriemi, endoplazmatickým retikulem s volnými ribozomy, kapénky lipidů, lysozomy a pohárkovými buňkami, které produkují velké množství mucinu (Grajek and Olejnik, 2004, Wang et al., 2006).

Výhodou buněčné linie HT-29 je morfologická a funkční diferenciací v *in vitro* podmínkách. Buněčná linie HT-29 ukazuje zralé enterocyty včetně polarizace a střevní hydrolasy. Je jedním z nejlepších dostupných modelů pro studium adheze laktobacilů (Lesuffleur et al., 1990). Wang et al. (2008) provedli studii adheze devíti laktobacilů na buněčné linii HT-29. Výsledky se mezi kmeny značně lišily. Nejvyšší schopnost adheze prokázal *L. reuteri*, který byl izolovaný z kuřecího střeva. Následuje *L. acidophilus* izolovaný z lidského střeva. Střední adheze byla pozorována u *L. johnsonii*, *L. gasseri*, *L. rhamnosus*, *L. bulgaricus* a *L. plantarum*. Kmeny, které byly izolovány z lidských nebo zvířecích střev měly mnohem větší schopnost adheze než kmeny jiného původu. Byla provedena celá řada obdobných studií se zaměřením na vliv probiotik a jejich adherenci na střevní epitelové buňky, které využívaly buněčnou linii HT-29 (Jensen et al., 2012, Blum et al., 1999, Tuomola et al., 2000, Ouwehand and Salminen, 2003).

Účinkem methotrexátu (MTX) došlo k selekci za vzniku speciálních buněk, které jsou schopny produkovat mucin a tato buněčná linie byla pojmenována jako HT29-MTX. Studie, kterou provedli Laparra a Sanz (2009) prokázala, že použití buněk HT29-MTX samostatně vykazuje výrazně nižší schopnost adherence u probiotických kmenů než u Caco-2 buněk. Důvodem je, že ve střevním epitelu jsou dva základní fenotypy buněk – enterocyty a pohárkové buňky (Pontier et al., 2001). Aby se při výzkumu co nejvíce přiblížili přirozeným podmínkám ve střevě, využívají buněčné linie Caco-2 zastupující enterocyty a buněčné linie HT29-MTX reprezentující pohárkové buňky. Tyto buňky byly ve směsné kultuře v poměru 9:1 (Pontier et al., 2001, Walter et al., 1996).

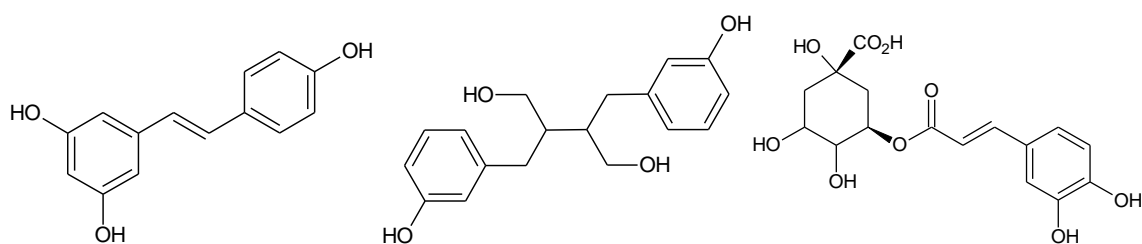
### 3.4. Rostlinné fenolové sloučeniny přítomné ve stravě

Fytochemikále jsou biologicky aktivní sekundární metabolity bez výživové hodnoty, přispívající k barvě a chuti rostlinných pletiv. Existuje více jak 10 000 druhů známých fytochemikálií (Drewnowski and Gomez-Carneros, 2000). Nejvýznamnější skupinu fytochemikálií tvoří fenolové sloučeniny. Ty mají kromě důležitého významu pro samotné rostliny i nezanedbatelný přínos pro lidské zdraví, a to díky jejich antioxidační aktivitě jak v *in vivo*, tak i v *in vitro* podmínkách (Cook and Samman, 1996). Konzumace ovoce, zeleniny a pití zeleného čaje zabraňuje vzniku rakoviny (Steinmetz and Potter, 1996, Yang and Wang, 1993). Mohou také zabránit mrtvici (Ness and Powles, 1997) nebo konzumací vína lze předcházet ischemické srdeční chorobě (Criqui and Ringel, 1994). Sójou je zase možné se chránit proti rakovině prsu a osteoporóze (Adlercreutz and Mazur, 1997). Rostlinné fenolové sloučeniny mají pozitivní efekt i při prevenci proti chronickým zánětům, arterioskleróze, obezitě a dalším (García-Lafuente et al., 2009).

Rostlinné fenolové sloučeniny se dělí na fenolové kyseliny, flavonoidy, stilbeny a lignany (Scalbert and Williamson, 2000, Manach et al., 2004). Nejznámější jsou flavonoidy, které jsou často součástí rostlinných pigmentů a jsou syntetizovány z fenylalaninu (Harborne and Turner, 1984). V závislosti na typu heterocyklu je rozlišujeme na flavonoly, flavony, isoflavony, flavanony, antokyany a flavanoly (katechiny a prokyanidy) (Manach et al., 2004).



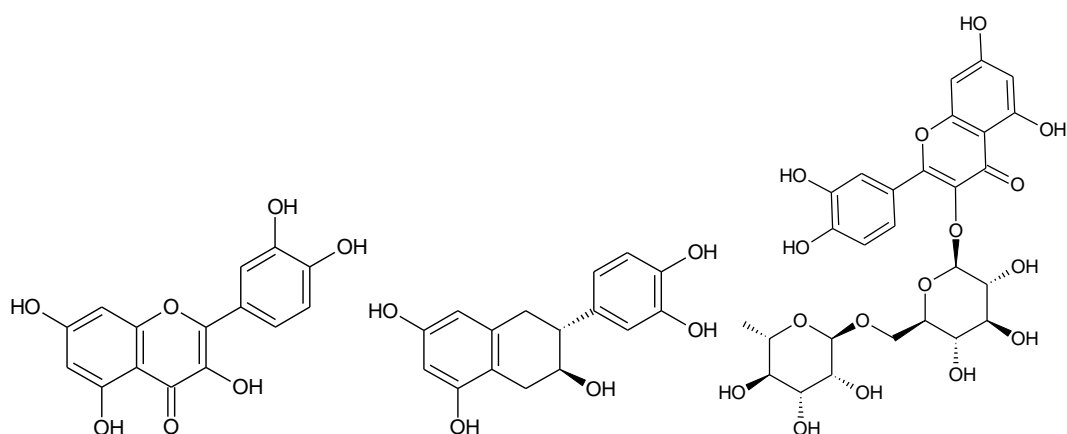
**Obr. 4:** Chemické struktury vybraných rostlinných fenolových sloučenin



Resveratrol (stilben)

Enterodiol (lignan)

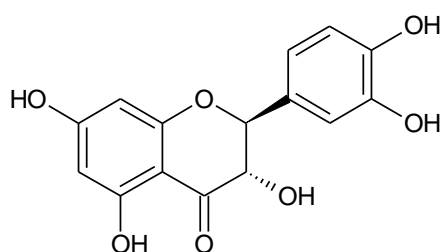
Kys. chlorogenová (fenolová kys.)



Kvercetin (flavonol)

(+)-Catechin (flavanol)

Rutin (flavonoidní glykosid)



Taxifolin (flavanonol)

Puupponen-Pimiä et al. (2001) zkoumali antimikrobiální účinky fenolových sloučenin. Zjistili, že extrakty z bobulí inhibují pouze bakterie gramnegativní a grampozitivní ne. Je to dáno rozdílem povrchových struktur buňky. Antokyany, kvercetin a kyselina chlorogenová inhibují růst *E. coli*. Thymol a karvakrol inhibují *E. coli* a *Salmonellu* díky jejich vlivu na vnější membráně (Helander et al., 1998).

### 3.4.1. Fenolové kyseliny

Fenolové kyseliny lze rozdělit na dvě skupiny a to deriváty kyseliny benzoové a deriváty kyseliny skořicové. Kyselina benzoová je nejrozšířenější fenolovou kyselinou v rostlinách (Velíšek, 1999). Vyskytuje se v silicích ve formě esterů. Její koncentrace v potravinách jsou cca 0,05 %. Nachází se nejen v ovoci a zelenině, ale také v jogurtech, kde vzniká hydrolýzou hippurové kyseliny působením enzymů bakterií mléčného kysání během zrání. Kyselina hippurová se ve formě sodné soli (benzoátu sodného = E211) přidává do potravin. Funguje jako konzervant ochucených nápojů a džusů, který zamezuje množení kvasinek a bakterií (Hong, Liang, & Liu, 2009). Derivátem kyseliny benzoové je kyselina gallová, která je základem hydrolyzovatelných tříslovin (gallotaniny, ellagitaniny). Zdrojem kyseliny gallové jsou čajové lístky, které mohou obsahovat až 4,5 g/kg čerstvé hmotnosti a černý rybíz, který obsahuje 40-130 mg/kg čerstvé hmotnosti (tab. 3) (Tomas-Barberan and Clifford, 2000).

Gallotaniny jsou označovány jako taniny nebo jako tříslová kyselina. Používají se také jako potravinářské aditivum. Jsou prevencí proti tvoření bílkovinných zákalů například ve víně nebo pivě. Ellagotaniny jsou součástí čeridel na bázi taninu a vyskytují se v extraktech a nálevech čajů z bylin. Přirozeně se nalézají v alkoholických nápojích zrajících v sudech. Třísloviny dodávají nápojům specifickou hořkou chuť (Velíšek, 1999). Ellagotaniny jsou obsaženy také v ostružinách, malinách, jahodách a vínu (Clifford and Scalbert, 2000). V potravinách se vyskytují nejčastěji v podobě kyseliny kávové nebo ferulové. Kyselina ferulová je esterovou vazbou pojena na hemicelulózu vlákniny. Hlavním zdrojem kys. ferulové jsou pšeničné otruby (5 mg/g sušiny) (Kroon et al., 1996). Rýže a ovesná mouka má stejné množství fenolických látek jako mouka pšeničná (63 mg/kg). V kukuřičné mouce je obsah fenolických látek 3 × vyšší (Shahidi, 1997).

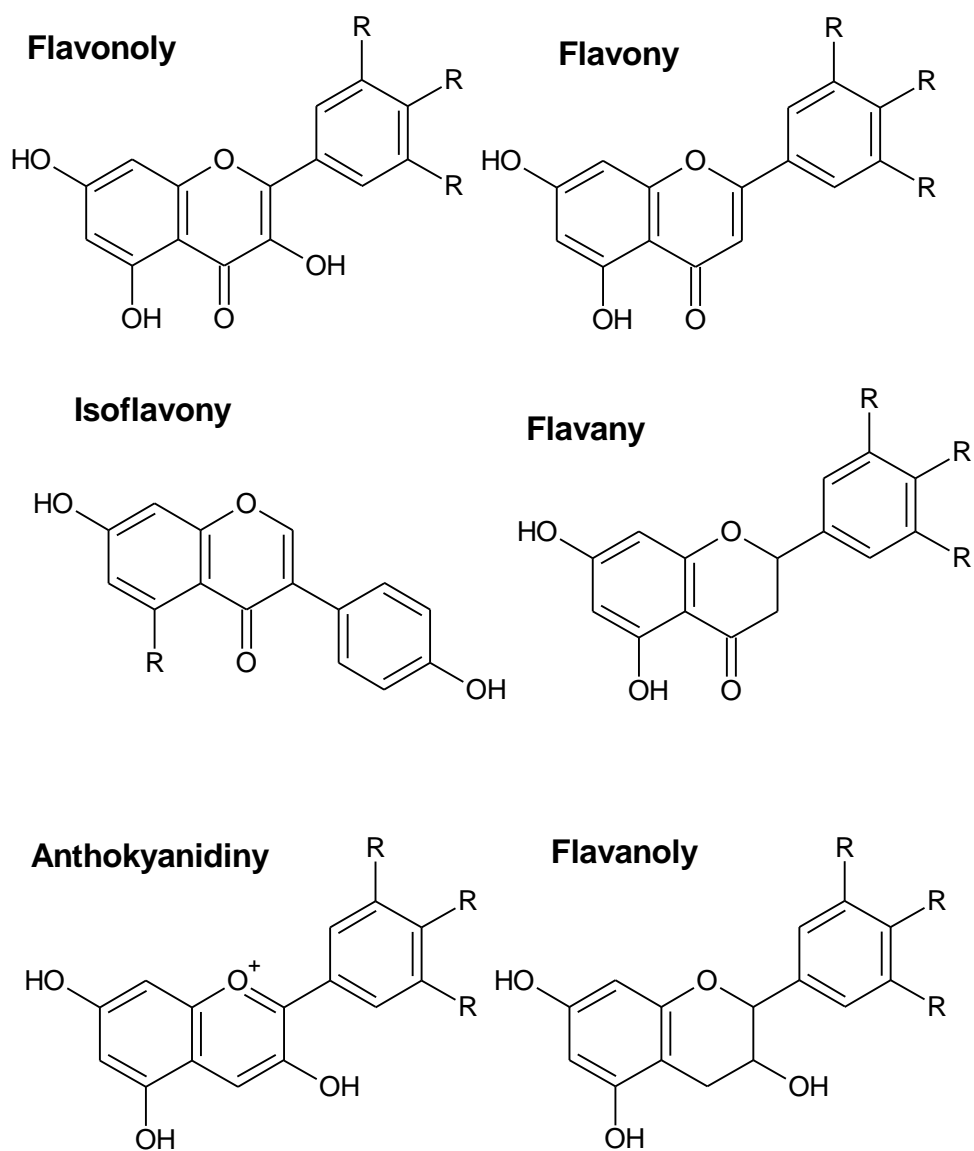
Kyselina hydroxyskořicová se nejvíce vyskytuje v borůvkách, kiwi, švestkách, třešních, jablkách o obsahu 0,5–2 g/kg čerstvé hmotnosti (tab. 3) (Macheix and Fleuriet, 1990). Vyskytuje se ve všech částech ovoce, ale nejvyšší koncentrace je na vnějších částech zralého ovoce. Koncentrace kys. hydroxyskořicové se snižuje v průběhu zrání a zvyšuje s velikostí plodu (Sosulski et al., 1982). Esterem kys. hydroxyskořicové je kys. chlorogenová a jedním z jejích nejbohatších zdrojů jsou kávová zrna. Zelená kávová zrna obsahují 6–10 % kys. chlorogenové v sušině (Rawel and Kulling, 2007). Chlorogenová kyselina je obecným názvem pro přírodní estery kyseliny chinové (Velíšek, 1999). Tyto látky mají velkou antioxidační a antivirovou aktivitu. Jsou také prevencí proti poškození jater (Farah and Donangelo, 2006).

Kyselina skořicová, kyselina 3-kumarová, kyselina kávová, kyselina ferulová a kyselina chlorogenová vykazovaly účinnost proti mikrobům a gramnegativním bakteriím při vysokých koncentracích (Puupponen-Pimiä et al., 2001).

### **3.4.2. Flavonoidy a flavonoidní glykosidy**

Flavonoidy jsou nejčastější rostlinné fenolové sloučeniny přítomné ve stravě (Reinli and Block, 1996). Existuje přibližně 6400 druhů flavonoidů. Jejich základem je flavanové jádro nebo 2-fenylbenzopyren. Tato struktura je charakteristická také pro flavony, isoflavony a neoflavony. V rostlinách je nejčastěji ve formě glykosidů, které jsou rozpustné v běžných fyziologických podmínkách, snižují jejich aktivitu a zajišťují stabilitu (Winkel, 2006).

**Obr. 5:** Chemická struktura flavonoidů



Hlavním flavonolem naší stravy je kvercetin, který je obsažen v ovoci, zelenině a nápojích. Jeho vysoká koncentrace je v cibuli 0,3 mg/g čerstvé hmotnosti (Hertog et al., 1992). Flavony jsou méně časté, ale vyskytují se v paprikách (luteolin) a celeru (apigenin) (Hertog et al., 1992). Zdrojem flavanonů jsou citrusové plody. Nejvíce je konzumován hesperidin v pomerančích o obsahu 125–250 mg/l šťávy (Rouseff et al., 1987). Hlavními flavanoly jsou katechiny, které nalezneme v čaji. V zeleném čaji je obsah katechinů 1 g/l (Lee et al., 1995). V černém čaji je obsah vzhledem k oxidaci poloviční (Ding et al., 1992). Dalším zdrojem je červené víno (270 mg/l) a čokoláda (Frankel et al., 1995). Proantokyanidy jsou polymerní flavanoly, které ve spojení s flavanoly způsobují trpkost potravin. Proantokyanidiny jsou obsažené v ovoci (jablka, hrušky, hrozny) nebo v nápojích (červené víno, čaj) (Santos-Buelga and Scalbert, 2000). Antokyaniny jsou pigmenty červeného ovoce. Jejich obsah je rozdílný např.: jahody mají 0,15 mg/g a třešně 4,5 mg/g (Clifford, 2000). Průměrný obsah u červených vín je 26 mg/l (Frankel et al., 1995).

Stilbeny v potravinářství nejsou tolik rozšířené. V léčivých rostlinách se nachází resveratrol, který je zkoumán pro antikarcinogenní vlastnosti (Jang et al., 1997). Koncentrace resveratrolu v červeném víně je velmi malá 0,3–2 mg/l a antikarcinogenní účinky jsou zde nepravděpodobné (Frankel et al., 1995). Další zdroje rostlinných fenolových látek jsou zobrazené v tabulce 3.

Isoflavonoidy patří do skupiny fenolových sloučenin, které jsou biologicky aktivní. Dokáží vytvořit přibližně 5000 struktur (Reynaud et al., 2005). V rostlině je nalezneme v podobě aglykonů, glykosidů jako konjugáty s glukosou, rhamnosou nebo apiosou. Isoflavonoidy dělíme na isoflavony, isoflavany, isoflavanchinony, isoflavanony, isoflav-3-eny, rotenoidy, dehydrorotenoidy, 12a-hydroxyrotenoidy, pterokarpany, pterokarpeny, 6a-hydroxypterokarpany, kumestany, 3-arylkumariny, kumaronochromony, 2-arylbenzofurany a isoflavanoly. Nejběžnější skupinou isoflavonoidů jsou isoflavony a pterokarpany (Veitch, 2009). Jsou nízkomolekulárními sekundárními metabolity, které jsou produkovány v první řadě rostlinami z čeledi bobovitých (*Fabaceae*, syn. *Leguminosae*). Působí jako fytoalexiny (obránné látky rostlin), fytoanticipiny (antimikrobiální látky) a insekticidy (přípravky k hubení hmyzu). Isoflavony v sóje jsou genistein a daidzein o obsahu 1 mg/g suché fazole (Reinli and Block, 1996). Vzhledem k jejich vlastnostem podobné estrogenu je možné, že napomáhají prevenci rakoviny prsu a osteoporózy (Adlercreutz and Mazur, 1997). Isoflavonoidy jsou zdraví prospěšnou součástí lidské stravy, jelikož mají antivirální a antioxidační účinky (Subramanian et al., 2006).

Některé flavonoidy vyskytující se v potravinách rostlinného původu mají antivirové vlastnosti, ty jsou založené na tvorbě komplexů s extracelulárními rozpustnými proteiny a sloučeninami v buněčné stěně mikroorganismu. Lipofilní flavonoidy dokáží narušit cytoplazmatickou membránu (Cowan, 1999). Kvercetin, taxifolin a flavonoidy červeného vína dokáží inaktivovat řadu virů a bránit jejich infekci. Třísloviny, obsažené v jahodách, inhibují střevní a herpes viry. Kvercetin, flavonol aglykon, které nalezneme v ovoci, jako jsou jablka, meruňky, fíky, švestky, jahody a rajčata, mají protivirovou aktivitu proti herpes simplex viru typu 1, parainfluenz viru typu 3 a polioviru typu 1 v *in vivo* a *in vitro* studiích. Rostlinné fenolové sloučeniny v čaji inhibují chřipkovou infekci typu A a B tím, že zamezují přilnutí viru na buňky a hesperetin inhibuje infekčnost virů herpes simplex typu, virů dětské obrny a parainfluenzy. Rutin má antimikrobiální účinky v zažívacím traktu. Kvercetin má inhibiční účinky proti *Salmonella enteritidis* a *Bacillus cereus* (Naczka and Shahidi, 2004).

**Tab. 3:** Zdroj rostlinných fenolových látek

<b>Obsah rostlinných fenolových látek</b>			
<b>Rostlinné fenolové látky</b>	<b>potravina</b>	<b>mg/kg čerstvé hmotnosti</b>	<b>Reference</b>
<b>hydroxybenzoová kyselina</b>	ostružiny	80–270	(Macheix and Fleuriet, 1990)
kyselina gallová	černý rybíz	40–130	
<b>kyselina hydroxyskořicová</b>	borůvky	2000–2200	(Fleuriet and Macheix, 2003, Friedman, 1997)
kyselina kávová	kiwi	600–1000	
kyselina chlorogenová	višně	180–1150	
kyselina kumarová	švestky	140–1150	
kyselina sinapová	jablka	50–600	
	hrušky	15–600	
<b>Antokyany</b>			
Kyanidin	ostružiny	1000–4000	(Mazza and Miniati, 1993, Clifford, 2000)
Malvidin	višně	350–4500	
	jahody	150–750	

**Flavonoly**

Kvercetin	kapusta	300–600	(Hollman and Arts, 2000, Crozier et al., 1997, Justesen et al., 1998)
Myricetin	rajčata	15–200	
	brokolice	40–100	
	jablka	20–40	
	borůvky	30–160	
Rutin	kroupy	15–25	

**Flavony**

Apigenin	celer	20–140	(Justesen et al., 1998, Hertog et al., 1992)
----------	-------	--------	--

**flavanony**

Hesperetin	pomerančový džus	215–685*	(Tomás-Barberán and Clifford, 2000, Mouly et al., 1994)
naringenin	grepový džus	100–650*	
eriodictyol	citrónový džus	50–300*	

**isoflavony**

Daidzein	sója	200–900	(Franke et al., 1999, Cassidy et al., 2000)
Glycitein	tofu	80–700	
	tempeh	430–530	

**Flavanoly**

Katechin	fazole	350–550	(Macheix and Fleuriet, 1990, Hollman and Arts, 2000, Arts et al., 2000)
epikatechin	rajčata	50–220	
	grep	30–175	
	broskev	50–140	
	zelený čaj	100–800*	
	černý čaj	60–500*	

---

\*obsah rostlinných fenolových látek v mg/ml

Biologické vlastnosti rostlinných fenolových sloučenin závisí na jejich biologické dostupnosti. Biodostupnost je definována jako množství potravinové složky, která je přítomná ve střevě a může přejít přes střevní bariéru. Pokud jsou fenolové sloučeniny absorbovány střevní bariérou, pak se zvyšuje antioxidační kapacita plazmy. Byla zkoumána řada potravin bohaté na rostlinné fenolové sloučeniny, jakou jsou čaje (Serafini et al., 1996), červené víno (Duthie et al., 1998), černý rybíz nebo jablečný džus (Young et al., 1999). Při měření koncentrací fenolických látek v plazmě a moči po požití čistých sloučenin nebo potravin se známým obsahem dané sloučeniny byla dokázána biologická dostupnost. Chemická struktura rostlinných fenolových sloučenin určuje rychlost a rozsah absorpce střev. Studie ukazují, že množství neporušených fenolových látek nalezené v moči se liší sloučenina od sloučeniny (tab. 4). Mimořádně nízký obsah v moči byl zjištěn u kvercetinu (0,3–1,4 %), ale vyšších hodnot dosahují isoflavony v sóje, flavanony v citrusových plodech a antokyaniny v červeném víně (3–6,7 %) (Fuhr and Kummert, 1995). Převážná část rostlinných fenolových sloučenin (75–99 %) není nalezena v moči. Buď nejsou tyto látky absorbovány střevní bariérou, nebo se vstřebávají a jsou vylučované do žluče. Další možností je, že jsou metabolizovány střevní mikroflórou nebo tkáněmi (Hollman et al., 1997).

Studie biologické dostupnosti prokázaly, že koncentrace flavonoidů v lidské plazmě je zřídka větší než 1  $\mu\text{M}$  (tab. 4). Této maximální koncentrace je dosaženo 1–2 hodiny po požití (Aziz et al., 1998) s výjimkou rostlinných fenolových sloučenin, které jsou rozložené a vstřebané mikroflórou tlustého střeva. Kvercetin a rutin dosahují maximální koncentrace v plazmě po 9 hod. po požití potravin s danou sloučeninou (Hollman et al., 1997). Pro většinu flavonoidů platí, že pokud jsou absorbované v tenkém střevě, pak jejich koncentrace prudce klesá (poločas přeměny je 1–2 hodiny). Poločas přeměny pro kvercetin je mnohem vyšší (24 hodin) (Hollman et al., 1997). Tuto pomalou přeměnu může vysvětlit vysoká afinita plazmy k albuminu (Dangles et al., 2001). Nicméně metabolity vytvořené mikroflórou rostlinných fenolových sloučenin v tračniku mají nižší pomalou přeměnu, protože dlouho zůstávají v tlustém střevě (Lu et al., 1995).



**Tab. 4:** Biologická dostupnost rostlinných fenolových látek v lidském těle

Rostlinné fenolové sloučeniny	Zdroj	Vstřebané množství (mg)	Maximální koncentrace v plazmě (μM)	Vyměšování močí (%)	Reference
<b>fenolové kyseliny</b>					
kyselina kávová		1000		27	(Jacobson et al., 1983)
<b>Flavonoly</b>					
Kvercetin	cibule	68	0,74	1,39	(Hollman et al., 1997)
	jablko	98	0,3	0,44	
Rutin	čistá sloučenina	202	0,3	0,35	
Isokvercetin	čistá sloučenina	144	3,2		(Hollman et al., 1999)
<b>Katechiny</b>					
epigalokatechin galát	extrakt ze zeleného čaje	525	4,4		(Nakagawa et al., 1997)
Katechin	červené víno (120 ml)				
		34	0,072		(Donovan et al., 1999)
Katechin	čistá sloučenina	500	2	0,45	(Balant et al., 1978)
<b>isoflavony</b>					
Genistein	sojové mléko	19	0,74	19,8	(Xu et al., 1994)
Daidzein		25	0,79	5,3	
<b>flavanony</b>					
Naringin	grepový džus (120 ml)	43	< 4	8,8	(Fuhr and Kummert, 1995)
Naringin	čistá sloučenina	500		4,9	(Ameer et al., 1996)
Hesperidin		500		3	
<b>antokyaniny</b>					
antokyaniny	červené víno (300 ml)	218		1–6,7	(Lapidot et al., 1998)

### 3.4.3. Antioxidanty - jejich mechanismy a biodostupnost

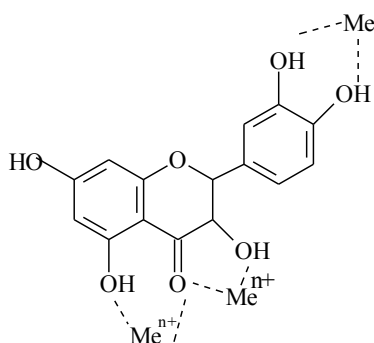
Epidemiologické studie prokázaly, že konzumace ovoce a zeleniny přispívá k prevenci onemocnění a to díky obsahu rostlinných fenolových sloučenin, které slouží jako antioxidanty (Bouayed, 2010). Antioxidanty např. v jablkách mají preventivní účinky proti chronickým onemocněním jako je rakovina plic, astma nebo kardiovaskulární onemocnění (Bouayed, 2010, Woods et al., 2003). Podle výzkumu Pellegrini et al. (2003) bylo zjištěno metodou FRAP (ferric reducing-antioxidant power) a TEAC (Trolox ekvivalent antioxidantní kapacity), že špenát vykazuje nejvyšší antioxidantní kapacitu (FRAP – 26,94 mmol Fe<sup>2+</sup>/kg FW<sup>3</sup>; TEAC – 8,49 mmol Trolox/kg FW). Podobných hodnot nabýval pepř, poté následovala paprika a chřest. Z plodů měly nejvyšší antioxidantní aktivitu bobule (ostružiny, červený rybíz a maliny). Těchto vysokých hodnot dosahovaly díky vysokému obsahu rostlinných

fenolových sloučenin a to zejména díky obsahu flavonoidů a antokyanů (Rice-evans et al., 1995). Z nápojů se jednalo o kávu a poté citrusové šťávy. Citrusy obsahují vysoké koncentrace fenolových látek a vitamínu C, které vykazují antioxidační vlastnosti (Gorinstein et al., 2001). Švestky se podle několika studií řadí mezi ovoce s nejučinnějšími antioxidačními vlastnostmi (Proteggente et al., 2002, Halvorsen et al., 2002, Szeto et al., 2002). Z olejů měl nejvyšší antioxidační účinky sójový olej a o něco nižší hodnoty vykazoval olej olivový extra panenský. Olivy mají vysoké antioxidační vlastnosti pravděpodobně kvůli vysokému obsahu hydroxytyrosolu a tyrosolu 30,8 a 38,6 mg/kg olivového oleje (Ryan et al., 1999, Miro-Casas et al., 2003).

Antioxidační vlastnosti rostlinných fenolových sloučenin mají několik mechanismů:

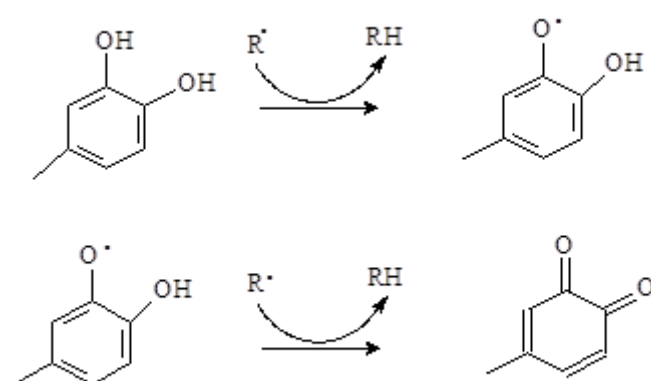
- I. Některé flavonoidy a rostlinné fenolové sloučeniny fungují jakou inhibitory enzymů, které produkují superoxidový anion-radikál např.: xantinoxidasa, proteinkinasa C. Inhibují také enzymy, které se účastní tvorby volných radikálů (cyklooxygenasa, lipoxygenasa, mikrosomální monooxygenasy) (Rice-Evans et al., 1997).
- II. Řada rostlinných fenolových sloučenin tvoří chelátové vazby s kovy. Nejčastěji vznikají s mědí nebo dvojmocným železem. Při Fentonově reakci vznikají reaktivní kyslíkové formy za účasti volných iontů mědi a dvojmocného železa (Rice-Evans et al., 1996).

**Obr. 6:** Vazebná místa pro kovy v molekulách flavonoidů



III. Rostlinné fenolové sloučeniny jsou lehce oxidovatelné. Oxidace je však závislá na redoxním potenciálu. Látky, které redukují některé volné radikály s oxidačními účinky mají nízkou hodnotu redox potenciálu ( $< 0,75$  V) např.: superoxidový, peroxylový, alkoxylový a hydroxylový radikál. Tyto radikály se v reakci přemění na méně reaktivní fenoxyllový radikál (F1-O $\cdot$ ) nebo na neradikálové chinoidní struktury tím, že je jim odebrán vodík. Radikály jsou vyloučeny dříve, než stačí reagovat s buněčnými komponentami (Rice-Evans et al., 1997).

**Obr. 7:** Vznik fenoxyllového radikálu a chinoidní struktury

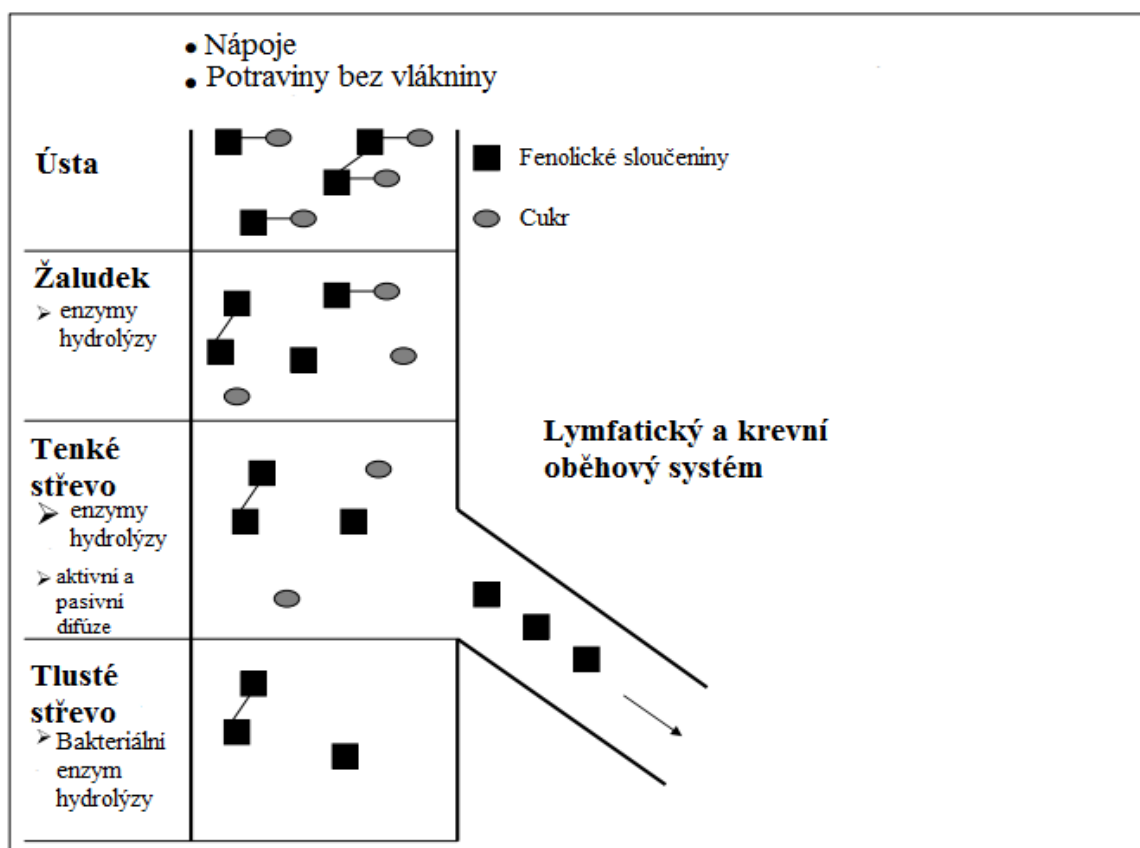


Účinky antioxidantů závisí nejen na jejich koncentraci v ovoci a zelenině, ale také na jejich biologické dostupnosti po požití (Pérez-Jiménez et al., 2009). Pouze antioxidanty z ovoce a zeleniny jsou biologicky dostupné, díky působení trávicích enzymů v tenkém střevě a bakteriální mikroflóry ve střevě tlustém (Saura-Calixto et al., 2007). Proces vstřebávání antioxidantů začíná v ústech, kde se ovoce a zelenina rozmělnuje. Klesající velikost částic zvětšuje povrchovou plochu, tím se zvětšuje účinnost trávení a gastrointestinální absorpce antioxidantů (Kulp et al., 2003).

V nedávných studiích se prokázalo, že biologická dostupnost konkrétních flavonoidů a fenolových sloučenin je mnohem vyšší, než se původně předpokládalo. Celý proces je znázorněn na obrázku 8. Metabolický proces fenolových látek z nápojů a potravin bez vlákniny začíná v lumenu tenkého střeva. Absorbované a modifikované látky se dostávají do jater a dalších orgánů (Manach et al., 2005). Většina rostlinných fenolových sloučenin prochází střevní stěnou a putuje do krevního oběhu (Lafay and Gil-Izquierdo, 2008). Aby k absorpci flavonoidů došlo, musí být odstraněny glykosidy z jejich skeletu (Pérez-

Jiménez et al., 2009). K tomu dochází za pomoci enzymů tenkého střeva například savčí  $\beta$ -glukosidásou (Denny and Buttriss, 2007). Kromě toho část flavonoidů přechází do tlustého střeva, kde jsou střevní mikroflórou rozloženy na jednoduché fenolové kyseliny. Fenolové kyseliny mohou být absorbovány do oběhového systému a nevykazovat žádné antioxidační účinky ve střevě (Del Rio et al., 2010). Ve formě aglykonu jsou absorbovány v horní části gastrointestinálního traktu (Saura-Calixto et al., 2007). V žaludku se absorbuje mnoho fenolických kyselin jako je kys. galová, kávová, ferulová, kumarová a chlorogenová (Lafay et al., 2006). Tyto kyseliny jsou absorbovány během 1–2 hodin po požití ovoce a zeleniny. Pokud jsou fenolové kyseliny esterifikované, pak biologická dostupnost klesá a dosahuje pouze 0,3–0,4 % z původního příjmu (Lafay and Gil-Izquierdo, 2008).

**Obr. 8:** Obecná lidská bioabsorpce fenolových sloučenin obsažených v nápojích nebo potravinách chudých na vlákninu.



Upraveno podle: Palafox-Carlos et al. (2011)

## 4. Metodika a materiál

### 4.1. Materiál

Rod *Lactobacillus* v podobě *Lactobacillus gasseri* R izolovaný ze stolice měsíce starého novorozence, kolorektální karcinom tlustého střeva buněčných linií Caco-2 a HT29-MTX, dále Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM), penicilin a streptomycin, hydrogenuhličitan sodný, pyruvát sodný, neesenciální aminokyseliny, fetální bovinní sérum (FBS), fosfátový pufr (PBS), Rogosa agar, trypsin, triton X-100, kvercetin, kyselina chlorogenová, katechin a epikatechin vše zakoupeno od Sigma-Aldrich (CZ). Plastik pro tkáňové kultury a to 24-jamkové destičky, serologické pipety, kultivační láhve, petriho misky vše od Thermo Fisher Scientific (UK).

### 4.2. Metodika

#### 4.2.1. Kultiva buněčné ko-kultury Caco-2 a HT29-MTX

Medium DMEM pro kultivaci se skládalo ze 450 ml DMEM, 10% FBS, 1% hydrogenuhličitanu sodného, 1% pyruvátu sodného, 1% neesenciální aminokyseliny, 1% penicilinu a streptomycinu.

Buněčné linie Caco-2 a HT29-MTX byly kultivovány v kultivačních láhvích o velikosti 75 cm<sup>2</sup> v 15 ml DMEM media. Buňky byly kultivovány 7 dní a každý druhý den bylo medium měněno za čerstvé. Sedmý den byly buněčné linie sklizeny. Nejprve byly buňky opláchnuty pomocí 5 ml PBS, které bylo odstraněno a k buňkám bylo přidáno 5 ml tripsinu na dobu 3–5 minut. Po této době byl triton neutralizován pomocí 1 ml DMEM media. Buňky byly uvolněné pomocí plastové škrabky a celý obsah láhve byl přenesen do 15 ml zkumavky typu Falcon a centrifugováno při 200 × g po dobu 10 minut. Následně bylo odstraněno staré medium a nahrazeno 5 ml nového, ve kterém byly buňky rozpuštěny. Z této suspenze byl odebrán 1 ml do nové kultivační láhve, kde již bylo připraveno 15 ml DMEM media, do kterého se byly buňky přeneseny. Takto byla láhev umístěna do CO<sub>2</sub> inkubátoru s 37 °C a 5% CO<sub>2</sub> atmosférou.

#### **4.2.2. Založení 24-jamkové destičky**

Z důkladně rozpuštěné buněčné suspenze byla odebrána kapka a dána na Bürkerovu komůrku. Byl spočítán obsah buněk v 1 ml suspenze. Pomocí výpočtu byla zjištěna přesná koncentrace sklizených buněk. Ko-kultúra byla vytvořena pomocí Caco-2 a HT29-MTX buněčných linií. Kdy do směsi bylo přidáno  $3,6 \times 10^4$  Caco-2 a  $0,4 \times 10^4$  HT29-MTX. Směs byla pipetována v objemu 500  $\mu$ l na jamku, celá destička byla uložena v kultivačním boxu. Krmení buněk probíhalo každé dva dny až do věku 14-ti dní, kdy u nich došlo k plné diferenciaci mikroklků a byly vhodné pro adhesní testy.

#### **4.2.3. Izolace laktobacilů**

Kmeny laktobacilů kultivované v Rogosa a MRS agaru byly promyty  $2 \times$  PBS a centrifugovány při  $2\ 000 \times g$  po dobu 10 minut. Následně naředěny v PBS, kdy došlo ke změření optické denzity při 420 nm a naředění kmenů na koncentraci  $2 \times 10^8$  CFU/ml.

#### **4.2.4. Test adherence**

Pro tento test byla modifikována metodika dle Jensen et al. (2012). Z jamky bylo odstraněno staré medium a každá jamka byla propláchnuta  $3 \times$  pomocí PBS. Následně bylo přidáno 0,5 ml DMEM media bez suplementů. Dále bylo přidáno 0,5 ml kmenů laktobacilů v koncentraci  $2 \times 10^8$  CFU/ml, kdy výsledná koncentrace byla  $1 \times 10^8$  CFU/ml. Následně bylo přidáno 100  $\mu$ l vzorku rozpuštěného v PBS v koncentraci 1 mg/ml, v kontrole bylo přidáno pouze PBS. Poté byla destička opět inkubována 2h v CO<sub>2</sub> inkubátoru. Po 2 h bylo odstraněno medium s laktobacily a vzorky, monovrstvy buněk byly  $3 \times$  pomocí PBS promyty. Do prázdné jamky bylo přidáno 300  $\mu$ l 1% Triton-X100 na dobu 30 vteřin a následně byl naředěn 700  $\mu$ l PBS. Obsah jamky byl převeden do eppendorfky a 4 násobně naředěn. Poté bylo odebráno 100  $\mu$ l vzorku do Petriho misky a zalito rogosa agarem. Petriho misky byly vloženy do inkubátoru s teplotou 37 °C na 48 h. Následně byl zjištěn bakteriální nárůst a vyhodnocen jako % oproti kontrole.

#### **4.2.5. Statistické vyhodnocení**

Získané výsledky jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka, dále jsou zjištěné hodnoty testovány metodou studentova rozdělení s následným Bonferroniho testem na hladině významnosti  $p < 0,5$ . Statistické vyhodnocování bylo provedeno v Excelu a IBM SPSS.

## 5. Výsledky

Náplní práce bylo zjistit, jakou adhezenci má *Lactobacillus gasseri* o koncentraci  $1 \times 10^8$  CFU/ml za přítomnosti následujících zkoumaných flavonoidů: katechinu, epikatechinu, kys. chlorogenové a kvercetin na ko-kultúře, která byla vytvořena pomocí buněčných linií Caco-2 a HT29-MTX o poměru 9:1. Výsledky prokázaly, že přítomnost těchto flavonoidů zvyšuje adhezenci *L. gasseri* na buněčné linii. Ze zkoumaných flavonoidů na adhezenci nejlépe působil kvercetin, který prokázal 10,53% adhezenci. Dalším byl katechin s adhezencí 8,86 %, kys. chlorogenová adherovala z 8,76 % a epikatechin z 8,30 %. *L. gasseri* na ko-kultúře bez žádného z flavonoidů adheroval ze 4,07 %. Výsledky jsou zobrazené v tabulce 5 a grafu 1.

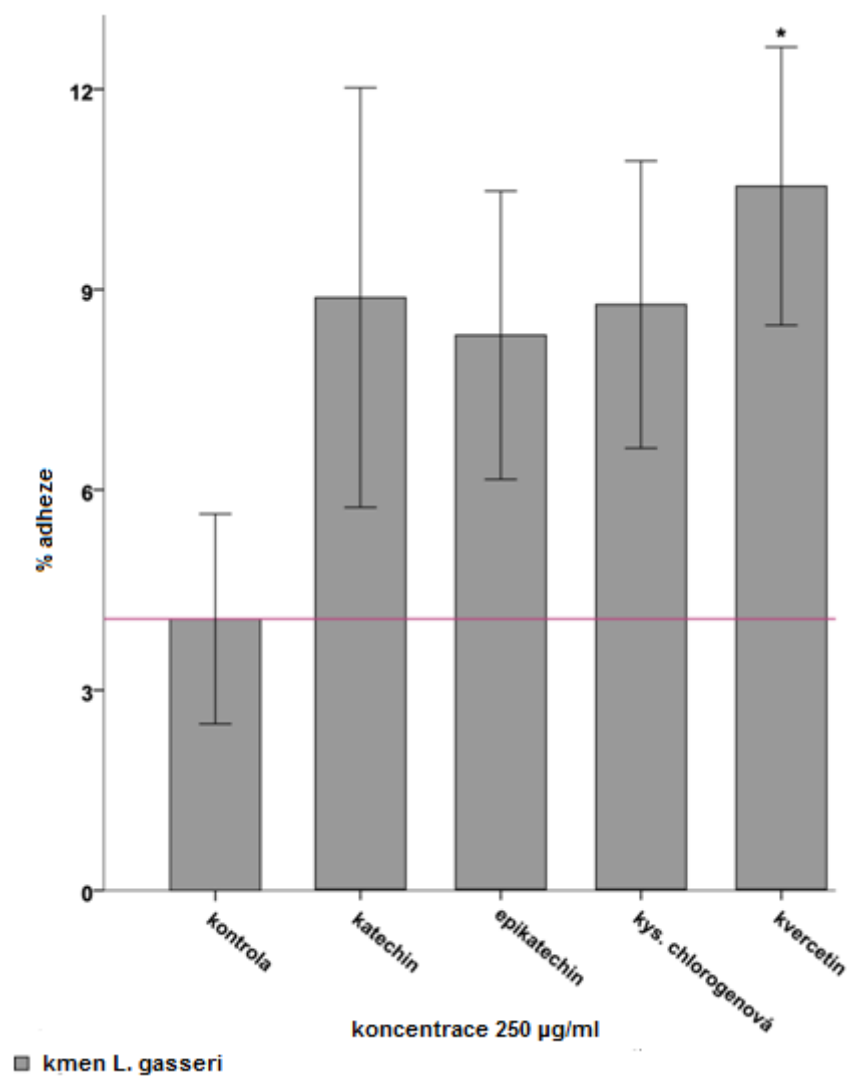
**Tab. 5:** Výsledky adherence

<i>L. gasseri</i>					
	Kontrola	Katechin	Epikatechin	Kys. chlorogenová	Kvercetin
	průměr±SD	průměr±SD	průměr±SD	průměr±SD	průměr±SD
% adherence	4,07 ± 1,57	8,86 ± 3,14	8,30 ± 2,16	8,76 ± 2,15	10,53 ± 2,08*

Průměr± směrodatná odchylka (SD); \* význam rozdílu hodnot  $p < 0,5$ ; flavonoidy jsou o koncentraci 250  $\mu\text{g/ml}$ .



**Graf 1:** Výsledky adherence



## 6. Diskuze

V současné době velká část populace trpí onemocněními, jako jsou alergie, urogenitální infekce, gastrointestinální infekce, syndrom dráždivého tračníku, průjemová onemocnění případně zácpy. Při těchto onemocněních mohou sloužit preventivně probiotika (Rolfe, 2000). Musí však překonat překážky gastrointestinálního traktu (pH žaludku, žlučové kyseliny). Tyto faktory výrazně snižují celkový počet probiotik dostávajících se do vlastních střev, kde mohou pozitivně působit na střevní lumen hostitele (Bove et al., 2013). Adheze probiotických bakterií na střevních epiteliálních buňkách může být pozitivním předpokladem pro jejich imunomodulační účinky, jelikož probiotické bakterie konkurují s patogeny o místa přilnutí na střevní epitel a mají podíl na vylučování těchto patogenů (Gleinser et al., 2012).

Bylo prokázáno, že mnoho kmenů probiotických bakterií dokáže inhibovat růst, adhezi na střevní buňky a metabolickou aktivitu enteropatogenních bakterií, jako je *Salmonella*, *Shigella*, enterotoxigenní *E. coli* nebo *Vibrio cholerae* (De Vrese and Marteau, 2007). Existuje mnoho mechanismů, kterými probiotika podporují zdraví střev včetně stimulace imunity, produkce antimikrobiálních látek a konkurence schopnosti s patogeny (Rolfe, 2000). Probiotické bakterie negativně působí na patogeny díky jejich mechanismům, které snižují hodnotu pH v lumenu střeva, produkují baktericidní látky, jako jsou organické kyseliny (kyselina mléčná, kyselina octová, kyselina máselná), peroxid vodíku a bakteriociny. Dalšími mechanismy účinku probiotik na patogeny jsou vzniklé metabolity (arginin, glutamin, mastné kyseliny s krátkým řetězcem, nebo konjugované linolové kyseliny) chránící střevo, imunologické mechanismy, regulace střevní motility a produkce hlenu (De Vrese and Marteau, 2007).

Probiotika na trhu nalezneme ve formě probiotických doplňků stravy, jako jsou fermentované mléčné výrobky (jogurt, podmáslí, acidofilní mléko, kefír), probiotické kapsle nebo kapky (Senok et al., 2005). Studie Pala et al. (2011) doporučuje fermentované výrobky jako prevenci kolorektálního karcinomu. Z výsledků je patrné, že vysoký příjem jogurtu s probiotiky snižuje riziko onemocnění kolorektálním karcinomem.

V České republice v roce 2010 onemocnělo různým typem rakoviny více než 80 tisíc lidí a přes 27 tisíc lidí zemřelo. Tato skutečnost představuje nárůst o celá 4 % oproti roku 2009. Mezi nejběžnější typy nádorového onemocnění zjištěného u českých pacientů patří kolorektální karcinom. Tuto diagnózu si jen v roce 2010 vyslechlo celkem 2864 mužů a 2044 žen, přičemž následkům podlehl 1271 mužů a 987 žen, což u obou skupin představuje úmrtnost 8,1 % (Dušek et al., 2010). Tím se Česká republika řadí na první příčky v četnosti výskytu kolorektálního karcinomu mezi Evropskými zeměmi. V celosvětovém měřítku za rok 2012 na rakovinu tlustého střeva zemřelo více jak 1,5 milionu lidí (Svod, 2014).

Díky této děsivé statistice si čím dál tím více lidí uvědomuje, jak je zdraví střev důležité. V důsledku čehož se zvyšuje poptávka po potravinových doplňcích, které obsahují probiotické bakterie. Mezi používané probiotické bakterie v potravinových doplňcích patří: *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. plantarum*, *L. salivarius*), *Bifidobacterium* (*B. longum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. thermophilum*), dále se využívají gram-pozitivní koky (*Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium*), *Bacillus subtilis*, kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*) a plísně (*Aspergillus oryzae*) (Fooks et al., 1999).

Podle nové studie Grand View Research, Inc. (PRWEB, 2014) globální trh s probiotiky očekává, že do roku 2020 dosáhne obratu v hodnotě 52 miliard dolarů. Dalším způsobem jak se bránit různým onemocněním trávicího traktu je zvýšený příjem potravin obsahující antioxidanty, které jsou schopny zhaset volné radikály. Mezi antioxidanty patří vláknina, flavonoidy, konjugované isomery linolové kyseliny, epigallokatechin, gallát, sojový protein, isoflavanony, vitaminy A, B, C, E, tokoferoly, vápník, selen, chlorophyllin, sulfidy, katechin, seasaminol, glutathion, kyselina močová, indoly, thiokyanáty a inhibitory proteas a rostlinné fenolové sloučeniny (Karakaya and Kavas, 1999). Všechny tyto sloučeniny se nachází v ovoci, zelenině, houbách a dalších rostlinách, jež jsou běžně konzumovány.

Řada epidemiologických studií potvrdila, že konzumace ovoce a zeleniny působí preventivně proti nemocem, které jsou způsobené účinky volných radikálů, jako jsou reaktivní formy kyslíku a dusíku (Wargovich, 2000, Bouayed, 2010, Woods et al., 2003, Shahidi, 1997). Světová zdravotnická organizace doporučuje zkonsumovat dohromady 400 g ovoce a zeleniny. Přitom průměrná konzumace v Evropě činí pouze 220 g zeleniny a 166 g ovoce na den (World Health, 2009). Denní příjem antioxidantů je tedy v průměru 1 g (Georgé et al., 2005). Antioxidační vlastnosti rostlinných fenolových sloučenin určuje jejich chemická struktura (Winkel, 2006). V trávicím traktu probíhá biotransformace, která může změnit

biologické vlastnosti fenolových sloučenin. Tyto změny mohou způsobit zesílení antioxidačních vlastností metabolitů nebo naopak jejich zeslabení nebo vymizení. *In vitro* efekt rostlinných fenolových sloučenin závisí nejen na účinnosti metabolitů, ale také na koncentraci a poločasu v séru (Gee and Johnson, 2001).

Pokud chceme zkoumat *in vitro* potencionální vliv probiotik na adhezenci ve střevním traktu člověka, pak je důležité lidský střevní lumen správně napodobit. Buněčné linie kolorektální karcinomu Caco-2 se často využívají v rámci *in vitro* metod simulujících střevní lumen (Flatmark et al., 2004). Jejich výhodou jsou dvě odlišné části, které jsou od sebe nepropustně oddělené (Simons and Fuller, 1985). Jsou schopné exprese genů kódujících protein 1, který má vaznost na kyselinu retinovou a protein 2, který na sebe váže retinol. Caco-2 buňky mají receptor pro termostabilní enterotoxin a epidermální růstový faktor (Grajek and Olejnik, 2004). Buněčná linie HT-29 pochází také z kolorektálního karcinomu tlustého střeva, avšak netvoří kartáčový lem (Wang et al., 2006). Dokáže poukázat na zralé enterocyty, polarizaci a střevní hydrolázu. Je jedním z nejdostupnějších a nejvhodnějších buněčných linií pro studium adheze laktobacilů (Lesuffleur et al., 1990).

Cílem této práce je ověření, zda a do jaké míry ovlivňují rostlinné fenolové sloučeniny běžně se vyskytující v ovoci a zelenině adhezenci laktobacilů *in vitro* na buněčném modelu střevního epitelu dle Jensen et al. (2012). Na modelu kolorektálního karcinomu tlustého střeva tvořeného buněčnými liniemi Caco-2 a HT29-MTX došlo k plné diferenciaci mikroklku po 14-ti dnech. K takovému modelu byly přidány flavonoidy (katechin, epikatechin, kyselina chlorogenová, kvercetin) a kmen *L. gasseri*. Z těchto pokusů vyplývá, že nejvýraznější pozitivní vliv měl kvercetin, který prokázal 10,53% adhezenci. Dalším byl katechin s adhezencí 8,86 %, kys. chlorogenová adherovala z 8,76 % a epikatechin z 8,30 % ve srovnání s neošetřenou kontrolou, která adherovala ze 4,07 %.

Studie Bernet et al. (1994) zabývající se vlivem adheze *Lactobacillus acidophilus* LA1 na lidské Caco-2 a HT29-MTX buňky o koncentraci  $2 \times 10^4$  HT29-MTX a  $1-4 \times 10^4$  Caco-2 prokázala, že *L. acidophilus* LA1 má silnější adhezenci k buňkám HT29-MTX než k buňkám Caco-2. Bustos et al. (2012) zkoumali a porovnávali adhezenci různých kmenů laktobacilů na Caco-2 a HT-29 buněčných liniích *in vitro*. Buněčné linie byly trypsinizované pomocí 0,25% roztokem trypsinu-EDTA (Sigma). Cílem bylo otestovat kmeny *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Lactobacillus casei* LC115, *Lactobacillus plantarum* IFPL379 a *Lactobacillus plantarum* IFPL935. Zjistilo se, že *L. acidophilus* LA-5 a *L. casei* LC115 mají nižší adhezenční schopnosti ke Caco-2 buňkám než k buňkám HT-29. *L. plantarum* IFPL379

prokázal nejvyšší adhezní schopnost ke Caco-2 buněčným liniím, zatímco *L. casei* LC115 měl ke Caco-2 buňkám adhezní nejnižší a k HT-29 nejvyšší. Podle jiné studie, kde zkoumali adhezi devíti různých laktobacilů na buněčné linii HT-29 nejlepší schopnost adherence prokázal *L. reuteri*, který byl izolován z kuřecího střeva. Druhým byl *L. acidophilus* ze střeva lidského, který svou schopnost adherence potvrdil ve výše zmíněné studii (Bustos et al., 2012). Dalšími laktobacily s průměrnou adhezní schopností byl *L. johnsonii*, *L. gasseri*, *L. rhamnosus*, *L. bulgaricus* a *L. plantarum* (Wang et al., 2008). Z těchto studií vyplývá, že nejlepšími laktobacily schopné adherence jsou *L. reuteri* na HT-29 buněčných liniích a *Lactobacillus casei* LC115 na liniích Caco-2. Pokud bychom hledali laktobacil s vyšší adhezní schopností pro oba druhy linií, pak bychom měli použít *L. acidophilus*.

Hervert-Hernández et al. (2009) zkoumali interakci mezi *L. acidophilus* a fenolovými sloučeninami z hroznových jader a extraktu získaných z hroznových výlisků. Mezi fenolové sloučeniny hroznů patří: katechin, malvidin, kyselina gallová, rutin a kyselina kávová. Výsledky diskového difúzního testu ukazují, že extrakt z hroznových jader a kyselina tříslová podporují růst *L. acidophilus* CECT 903 při koncentraci 5000 µg/disk zatímco hroznové výlisky nevykazovaly žádné stimulační, ale ani inhibiční účinky. Extrakt z hroznových jader a hroznové výlisky mají velice podobné složení fenolových látek, ale liší se v obsahu extrahovatelných rostlinných fenolových sloučenin. Extrakt hroznových jader obsahuje o 50 % více těchto látek, pravděpodobně proto laktobacily vykazovaly takový rozdíl v růstu. Prokázalo se, že ze všech z výše uvedených sloučenin aktivuje faktory růstu laktobacilů pouze katechin (růstová zóna 4 mm s koncentrací 99,6 mg/ml) a kyselina tříslová (růstová zóna 10 mm s koncentrací 100,5 mg/ml). Chung et al. (1998) uvádějí, že *L. acidophilus* ATCC 4356 nevykazoval žádnou reakci na kyselinu tříslovou až do koncentrace 500 µg/ml. Autoři dokonce naznačili, že vyšší koncentrace by způsobila inhibici růstu laktobacilu, avšak Hervert-Hernández et al. (2009) tuto myšlenku vyvrátili svou studií, kde použil koncentraci 10 × vyšší na *L. acidophilus* CECT 903 a podpořil tím jeho růst. Toto zjištění naznačuje, že kmen *L. acidophilus* CECT 903 má schopnost degradovat třísloviny a získávat z nich energii pro svůj růst (Rodríguez et al., 2008). Kyselina tříslová inhibuje růst některým patogenním bakteriím ve střevě. Pravděpodobně to způsobuje silná vazebná síla kyseliny tříslové na železo, které aerobní mikroorganismy potřebují ke snížení ribonukleotidového prekurzoru DNA a ke vzniku hemové skupiny (Chung et al., 1998).

Skupina flavan-3-olů, kam patří katechin a epikatechin, tvoří 46 % sušiny hroznových výlisků (Jiménez et al., 2008). Zejména katechin extrahovaný z čaje vykazuje antimikrobiální vlastnosti proti některým patogenním bakteriím, jako jsou například *Serratia marcescens*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa* nebo *Candida albicans* (Almajano et al., 2008). Naproti tomu katechin podporuje růst probiotických bakterií v trávicím traktu. To dokázala studie Hervert-Hernández et al. (2009), při použití *L. acidophilus* CECT 903 a studie García-Ruiz et al. (2008), kde narostl *L. hilgardii*.

Kvercetin má antimikrobiální aktivitu proti patogenům *S. marcescens*, *E. coli*, *P. mirabilis* a *K. pneumoniae* (Vaquero et al., 2007). Při použití *L. hilgardii* kvercetin o koncentraci 40 mg/l podporoval jeho růst. Naopak u *L. acidophilus* CECT 903 kvercetin nestimuloval, ale ani neinhiboval růst bakterie (Hervert-Hernández et al., 2009).

Kyselina gallová působí antimikrobiálně k *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* a *Klebsiella pneumoniae* (Vaquero et al., 2007), zatímco u střevních bakterií rodu *Bacteroides*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Enterobacter* a *Salmonella* růst neinhibuje při koncentraci kyseliny 500 µg/ml (Chung et al., 1998). To platí i u *L. acidophilus* CECT 903 a *L. acidophilus* ATCC 4356, kde kyselina gallová neměla na jejich růst žádný vliv (Hervert-Hernández et al., 2009).

Hydroxyskořicové kyseliny, kam patří i kyselina chlorogenová, vykazují inhibiční účinnost proti kmenům *Listeria monocytogenes* (Puupponen-Pimiä et al., 2005). Zvláště kyselina kávová inhibuje růst patogenních bakterií *S. marcescens*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus* (Vaquero et al., 2007). Růst *L. acidophilus* CECT 903 kyselina kávová nijak neomezuje. Je možné, že *L. acidophilus* dokáže metabolizovat hydroxyskořicové kyseliny redukcí postranního řetězce za vzniku 2-hydroxyfenylpropionové kyseliny, která může být nadále dekarboxylována na p-etylfenoly (Hervert-Hernández et al., 2009).

Možným vysvětlením proč rostlinné fenolové kyseliny podporují růst bakterií je, že některé mikroorganismy jsou schopné tyto sloučeniny používat jako substráty. Některé druhy bakterií, jako jsou například laktobacily, mají schopnost metabolizovat rostlinné fenolové kyseliny během růstu. Pak vzniká energie dodávající se do buněk bakterie, které začnou růst (García-Ruiz et al., 2008). Je zajímavé, že rostlinné fenolové sloučeniny dokáží inhibovat patogenní bakterie a naopak stimulovat růst bakterií nám prospěšných. Důvody, proč tomu tak je, nejsou zatím zcela prozkoumané.

Studie Parkar et al. (2008) zkoumala antibakteriální účinky rostlinných fenolových sloučenin. Byla snaha se co nejvíce přiblížit běžné koncentraci přítomné v tlustém střevu. Naringenin a kvercetin měly nejnižší minimální inhibiční koncentraci (MIC) 62,5–125 µg/ml u všech vybraných bakterií: *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* a *L. rhamnosus*. Rutin naopak životaschopnost těchto bakterií neovlivňoval. Katechin, epikatechin a kyselina chlorogenová inhibovaly zmíněné bakterie s MIC od 125–1000 µg/ml. Grampozitivní probiotikum *L. rhamnosus* je méně citlivé na fenolové sloučeniny, které jsou přítomné ve střevě s MIC alespoň 125 µg/ml, což ukazuje, že životaschopnost bakterie *Lactobacillus* je rostlinnými fenolovými sloučeninami ve střevě nedotčená. Dále bylo zjištěno, že *L. rhamnosus* je schopný 2 × více adherovat na nebuněčnou linii Caco-2 než je tomu v případě *S. typhimurium*. Kyselina chlorogenová dokázala snížit adhezenci *S. typhimurium* na Caco-2 buňky o 46–56 %, zatímco epikatechin byl jedním z nejméně účinných. Phoridzin a rutin výrazně zvýšily adhezenci *L. rhamnosus*.

Mechanismy fenolových sloučenin, které mohou ovlivňovat bakteriální adhezenci nejsou zcela prozkoumané. Rostlinné fenolové sloučeniny jsou schopné působit na mikrobiální membránové proteiny, enzymy a lipidy a tím měnit propustnost buněk, únik protonů, iontů a makromolekul. Existují důkazy, že rostlinné fenolové sloučeniny narušují tvoření biofilmu, který ulpívá na bakteriích (Huber et al., 2003). Je možné, že inhibují glukosyltransferázy, které zprostředkovávají adhezi *Streptococcus mutans* a jiných bakterií, které se vyskytují na zubech nebo snižují jejich hydrofóbnost (Matsumoto et al., 2003). Současné studie potvrzují, že brusinkové džusy snižují adhezenci uropatogenní *E. coli* změnou povrchu makromolekul (Liu et al., 2006). U šťáv z bobulí byla prokázána inhibice vazby bakterie *Neisseria meningitidis* Pili na lidské epitelové buňky. Jejich rostlinné fenolové sloučeniny vyskytující se ve slupce jablek prokazují inhibiční účinek *in vitro* proti *Helicobacter pylori* (Pastene et al., 2010). Avšak vše záleží na biologické dostupnosti rostlinných fenolových sloučenin v našem těle.

Biologická dostupnost rostlinných fenolových sloučenin je variabilní v závislosti na jejich struktuře a konjugaci. Biologická dostupnost u většiny antokyanů (dodávají barvu lesním plodům a červenému vínu) je < 0,1 %, 10–30 % pro flavanony (citrusy) a flavanoly (červené víno, čaj a kakao) a 30–50 % je u isoflavonů (sojové výrobky) a kyseliny gallové (červené víno, čaj, ovoce) (Scalbert and Williamson, 2000). Velká část rostlinných fenolových sloučenin (75–99 %) není přítomna v moči, což znamená, že nejsou vstřebatelné střevní bariérou, ale že jsou vstřebané a vylučované žlučí. Nebo je možné, že metabolizují střevní mikroflóru. Dále jsou citlivé na alkalické prostředí, které je v tenkém střevě, takže existuje možnost, že jsou rostlinné fenolové sloučeniny transformovány před jejich absorpcí (Bermúdez-Soto et al., 2007). Studie Laurent et al. (2007) potvrdila úvahy o enzymatickém trávení v pankreatu. Ve své studii zkoumali biologickou dostupnost fenolových sloučenin v extraktech hroznů na Caco-2 buňkách. Slinné a žaludeční trávení u nich neprokázalo žádný vliv na stabilitu rostlinných fenolových sloučenin. Interakce mezi proteiny v trávicích šťávách nebo v enzýmech a fenolovými sloučeninami snižují biologickou dostupnost v závislosti na čase přítomnosti ve střevě.



## 7. Závěr

V této práci jsme zjistili, že námi vybrané rostlinné fenolové sloučeniny (katechin, epikatechin, kys. chlorogenová a kvercetin) pozitivně ovlivňují adheenci *Lactobacillus gasseri* na *in vitro* buněčném modelu střevního epitelu, který byl vytvořený buněčnými liniemi Caco-2 a HT29-MTX. Ze zkoumaných flavonoidů na adheenci nejlépe působil kvercetin, který prokázal 10,53% adheenci. Dalším byl katechin s adheencí 8,86 %, kys. chlorogenová adherovala z 8,76 % a epikatechin z 8,30 %. *L. gasseri* projevila adheenci na ko-kulturu bez žádného z flavonoidů ze 4,07 %. Míra schopnosti adherovat je i podle dalších studií druhově specifická. Záleží nejen na druhu rostlinné fenolové sloučeniny, ale i na kmenu probiotické bakterie a modelu střevního epitelu.

Bohužel většina získaných informací o adhezi rostlinných fenolových sloučenin a probiotik na buňky střevního epitelu jsou získané *in vitro* metodami, proto nemůžeme vyvozovat stejné závěry pro *in vivo* podmínky, kde se látky mohou chovat odlišně. A však není pochyb o tom, že umírněná konzumace ovoce a zeleniny a jejich šťáv je pro člověka zdraví prospěšná. Ovoce a zelenina jsou přirozeným bohatým zdrojem nutričně cenných látek, které dokáží ovlivnit i adhezi na střevní sliznici, která je považována za důležitou pro kolonizaci střev a předpokládá se, že stimuluje imunitní systém hostitele. V dnešní době je kladen velký důraz na konzumaci ovoce a zeleniny, a tak mějme na paměti, že: „ Neexistují zdravé a nezdravé potraviny, ale pouze zdravá a nezdravá množství“ (World Health, 2003).

## 8. Použitá literatura

- Aas, J. A., Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I., Dewhirst, F. E. (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *Journal of clinical microbiology*. 43(11). 5721-5732.
- Adlercreutz, H., Mazur, W. (1997). Phyto-oestrogens and Western diseases. *Annals of medicine*. 29(2). 95-120.
- Almajano, M. P., Carbo, R., Jiménez, J. A. L., Gordon, M. H. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry*. 108(1). 55-63.
- Ameer, B., Weintraub, R. A., Johnson, J. V., Yost, R. A., Rouseff, R. L. (1996). Flavanone absorption after naringin, hesperidin, and citrus administration. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 60(1). 34-40.
- Arts, I. C. W., van de Putte, B., Hollman, P. C. H. (2000). Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods. *Journal of agricultural and food chemistry*. 48(5). 1746-1751.
- Artursson, P., Karlsson, J. (1991). Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 175(3). 880-885.
- Atuma, C., Strugala, V., Allen, A., Holm, L. (2001). The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state *in vivo*. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 280(5). G922-G929.
- Aziz, A. A., Edwards, C. A., Lean, M. E. J., Crozier, A. (1998). Absorption and excretion of conjugated flavonols, including quercetin-4'-O- $\beta$ -glucoside and isorhamnetin-4'-O- $\beta$ -glucoside by human volunteers after the consumption of onions. *Free radical research*. 29(3). 257-269.
- Balant, L., Burki, B., Wermeille, M., Golden, G. (1978). Comparison of some pharmacokinetic parameters of (+)-cyanidanol-3 obtained with specific and non-specific analytical methods. *Arzneimittel-Forschung*. 29(11). 1758-1762.
- Bednář, M. (1996). *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha. (1). Merwil. 560 s. ISBN 80-238-0297-6.

- Bermúdez-Soto, M. J., Tomás-Barberán, F. A., García-Conesa, M. T. (2007). Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to *in vitro* gastric and pancreatic digestion. *Food Chemistry*. 102(3). 865-874.
- Bernet, M. F., Brassart, D., Neeser, J. R., Servin, A. L. (1994). *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut*. 35(4). 483-489.
- Blum, S., Reniero, R., Schiffrin, E. J., Crittenden, R., Mattila-Sandholm, T., Ouwehand, A. C., Salminen, S., von Wright, A., Saarela, M., Saxelin, M., Collins, K., Morelli, L. (1999). Adhesion studies for probiotics: need for validation and refinement. *Trends in Food Science & Technology*. 10(12). 405-410.
- Booijink, C. C. G. M., Zoetendal, E. G., Kleerebezem, M., de Vos, W. M. (2007). Microbial communities in the human small intestine: coupling diversity to metagenomics.
- Boot, H. J., Kolen, C. P. A. M., Pot, B., Kersters, K., Pouwels, P. H. (1996). The presence of two S-layer-protein-encoding genes is conserved among species related to *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiology*. 142(9). 2375-2384.
- Bouayed, J. (2010). Polyphenols: a potential new strategy for the prevention and treatment of anxiety and depression. *Current Nutrition & Food Science*. 6(1). 13-18.
- Bove, P., Russo, P., Capozzi, V., Gallone, A., Spano, G., Fiocco, D. (2013). *Lactobacillus plantarum* passage through an oro-gastro-intestinal tract simulator: carrier matrix effect and transcriptional analysis of genes associated to stress and probiosis. *Microbiological research*. 168(6). 351-359.
- Brittan, J. L., Nobbs, A. H. Group B *Streptococcus pili* mediate adherence to salivary glycoproteins. *Microbes and Infection*(0).
- Buck, B. L., Altermann, E., Svingerud, T., Klaenhammer, T. R. (2005). Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(12). 8344-8351.
- Bustos, I., Garcia-Cayuela, T., Hernandez-Ledesma, B., Pelaez, C., Requena, T., Martínez-Cuesta, M. C. (2012). Effect of flavan-3-ols on the adhesion of potential probiotic lactobacilli to intestinal cells. *Journal of agricultural and food chemistry*. 60(36). 9082-9088.

- Capaldo, C. T., Farkas, A. E., Nusrat, A. (2014). Epithelial adhesive junctions. F1000prime reports. 6.
- Cassidy, A., Hanley, B., Lamuela-Raventos, R. M. (2000). Isoflavones, lignans and stilbenes—origins, metabolism and potential importance to human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80(7). 1044-1062.
- Chaban, B., Links, M. G., Jayaprakash, T. P., Wagner, E. C., Bourque, D. K., Lohn, Z., Albert, A. Y. K., van Schalkwyk, J., Reid, G., Hemmingsen, S. M. (2014). Characterization of the vaginal microbiota of healthy Canadian women through the menstrual cycle. *Microbiome*. 2(1). 23.
- Chauvière, G., Coconnier, M.-H., Kernéis, S., Fourniat, J., Servin, A. L. (1992). Adhesion of human *Lactobacillus acidophilus* strain LB to human enterocyte-like Caco-2 cells. *Journal of General Microbiology*. 138(8). 1689-1696.
- Chen, T., Wu, Q., Li, S., Xiong, S., Jiang, S., Tan, Q., Zhang, Z., Zhu, D., Wei, H. (2014). Microbiological quality and characteristics of probiotic products in China. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 94(1). 131-138.
- Chung, K. T., Lu, Z., Chou, M. W. (1998). Mechanism of inhibition of tannic acid and related compounds on the growth of intestinal bacteria. *Food and Chemical Toxicology*. 36(12). 1053-1060.
- Clifford, M. N. (2000). Anthocyanins—nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80(7). 1063-1072.
- Clifford, M. N., Scalbert, A. (2000). Ellagitannins, occurrence in food, bioavailability and cancer prevention. *J Food Sci Agric*. 80. 1118-1125.
- Collado, M. C., Meriluoto, J., Salminen, S. (2007). Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus. *Letters in applied microbiology*. 45(4). 454-460.
- Collins, J. K., Thornton, G., Sullivan, G. O. (1998). Selection of probiotic strains for human applications. *International dairy journal*. 8(5). 487-490.
- Collins, M. D., Gibson, G. R. (1999). Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 69(5). 1052s-1057s.

- Cook, N. C., Samman, S. (1996). Flavonoids—chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of nutritional biochemistry*. 7(2). 66-76.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*. 12(4). 564-582.
- Criqui, M. H., Ringel, B. L. (1994). Does diet or alcohol explain the French paradox? *The Lancet*. 344(8939). 1719-1723.
- Crozier, A., Lean, M. E. J., McDonald, M. S., Black, C. (1997). Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and celery. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45(3). 590-595.
- Dangles, O., Dufour, C., Manach, C., Morand, C., Remesy, C. (2001). Binding of flavonoids to plasma proteins. *Methods in enzymology*. 335. 319-333.
- De Vrese, M., Marteau, P. R. (2007). Probiotics and prebiotics: effects on diarrhea. *The Journal of nutrition*. 137(3). 803S-811S.
- Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M., Palenzona, D. (2000). Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters in applied microbiology*. 31(6). 438-442.
- Del Rio, D., Costa, L. G., Lean, M. E. J., Crozier, A. (2010). Polyphenols and health: what compounds are involved? *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 20(1). 1-6.
- Denny, A., Buttriss, J. (2007). Plant foods and health: focus on plant bioactives. *Synthesis report*(4).
- Ding, Z., Kuhr, S., Engelhardt, U. H. (1992). Influence of catechins and theaflavins on the astringent taste of black tea brews. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*. 195(2). 108-111.
- Donovan, J. L., Bell, J. R., Kasim-Karakas, S., German, J. B., Walzem, R. L., Hansen, R. J., Waterhouse, A. L. (1999). Catechin is present as metabolites in human plasma after consumption of red wine. *The Journal of nutrition*. 129(9). 1662-1668.
- Drewnowski, A., Gomez-Carneros, C. (2000). Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review. *The American journal of clinical nutrition*. 72(6). 1424-1435.

- Duthie, G. G., Pedersen, M. W., Gardner, P. T., Morrice, P. C., Jenkinson, A. M., McPhail, D. B., Steele, G. M. (1998). The effect of whisky and wine consumption on total phenol content and antioxidant capacity of plasma from healthy volunteers. *European Journal of Clinical Nutrition*. 52(10). 733-736.
- Dušek, L., Mužík, J., Gelnarová, E., Fínek, J., Vyzula, R., Abrahámová, J. (2010). Cancer incidence and mortality in the Czech Republic. *Klin onkol*. 23(5). 311-324.
- Farah, A., Donangelo, C. M. (2006). Phenolic compounds in coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 18(1). 23-36.
- Flatmark, K., Mælandsmo, G. M., Martinsen, M., Rasmussen, H., Fodstad. (2004). Twelve colorectal cancer cell lines exhibit highly variable growth and metastatic capacities in an orthotopic model in nude mice. *European Journal of Cancer*. 40(10). 1593-1598.
- Fleuriet, A., Macheix, J.-J. (2003). Phenolic acids in fruits and vegetables. *Flavonoids in health and disease*. 1-42.
- Fooks, L. J., Fuller, R., Gibson, G. R. (1999). Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *International dairy journal*. 9(1). 53-61.
- Franke, A. A., Hankin, J. H., Yu, M. C., Maskarinec, G., Low, S.-H., Custer, L. J. (1999). Isoflavone levels in soy foods consumed by multiethnic populations in Singapore and Hawaii. *Journal of agricultural and food chemistry*. 47(3). 977-986.
- Frankel, E. N., Waterhouse, A. L., Teissedre, P. L. (1995). Principal phenolic phytochemicals in selected california wines and zheir antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43(4). 890-894.
- Friedman, M. (1997). Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols. A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45(5). 1523-1540.
- Fuhr, U., Kummert, A. L. (1995). The fate of naringin in humans: A key to grapefruit juice-drug interactions? *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 58(4). 365-373.
- Gaillard, J.-L., Berche, P., Mounier, J., Richard, S., Sansonetti, P. (1987). *In vitro* model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infection and immunity*. 55(11). 2822-2829.

- García-Lafuente, A., Guillamón, E., Villares, A., Rostagno, M. A., Martínez, J. A. (2009). Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflammation Research*. 58(9). 537-552.
- García-Ruiz, A., Bartolomé, B., Martínez-Rodríguez, A. J., Pueyo, E., Martín-Álvarez, P. J., Moreno-Arribas, M. V. (2008). Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. *Food Control*. 19(9). 835-841.
- Gee, J. M., Johnson, I. T. (2001). Polyphenolic compounds: interactions with the gut and implications for human health. *Current medicinal chemistry*. 8(11). 1245-1255.
- Gendler, S. J., Spicer, A. P. (1995). Epithelial mucin genes. *Annual review of physiology*. 57(1). 607-634.
- Georgé, S., Brat, P., Alter, P., Amiot, M. J. (2005). Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(5). 1370-1373.
- Gleinser, M., Grimm, V., Zhurina, D., Yuan, J., Riedel, C. U. (2012). Improved adhesive properties of recombinant bifidobacteria expressing the *Bifidobacterium bifidum*-specific lipoprotein BopA. *Microb Cell Fact*. 11(1). 80-94.
- González-Rodríguez, I., Sánchez, B., Ruiz, L., Turróni, F., Ventura, M., Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., Margolles, A. (2012). Role of extracellular transaldolase from *Bifidobacterium bifidum* in mucin adhesion and aggregation. *Applied and environmental microbiology*. 78(11). 3992-3998.
- Gorinstein, S., Martín-Belloso, O., Park, Y.-S., Haruenkit, R., Lojek, A., Cíž, M., Caspi, A., Libman, I., Trakhtenberg, S. (2001). Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits. *Food Chemistry*. 74(3). 309-315.
- Grajek, W. O., Olejnik, A. (2004). Epithelial cell cultures *in vitro* as a model to study functional properties of food. *Pol J Food Nutr Sci*. 13(54). 5-24.
- Granato, D., Perotti, F., Masserey, I., Rouvet, M., Golliard, M., Servin, A., Brassart, D. (1999). Cell surface-associated lipoteichoic acid acts as an adhesion factor for attachment of *Lactobacillus johnsonii* La1 to human enterocyte-like Caco-2 cells. *Applied and environmental microbiology*. 65(3). 1071-1077.
- Gum Jr, J. R. (1995). Human mucin glycoproteins: varied structures predict diverse properties and specific functions. *Biochemical Society Transactions*. 23(4). 795-799.

- Halvorsen, B. L., Holte, K., Myhrstad, M. C. W., Barikmo, I., Hvattum, E., Remberg, S. F., Wold, A.-B., Haffner, K., Baugerød, H., Andersen, L. F. (2002). A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *The Journal of nutrition*. 132(3). 461-471.
- Harborne, J. B., Turner, B. L. (1984). *Plant chemosystematics*. London *etc.*: Academic Press x, 562p.-illus., maps.. En *Chemotaxonomy* (KR, 198402847).
- Hattori, M., Taylor, T. D. (2009). The human intestinal microbiome: a new frontier of human biology. *DNA research*. 16(1). 1-12.
- Helander, I. M., Alakomi, H.-L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., Gorris, L. G. M., von Wright, A. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of agricultural and food chemistry*. 46(9). 3590-3595.
- Hentges, D. J. (2012). *Human intestinal microflora in health & disease*: Academic Press.
- Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H., Katan, M. B. (1992). Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *Journal of agricultural and food chemistry*. 40(12). 2379-2383.
- Hervet-Hernández, D., Pintado, C., Rotger, R., Goñi, I. (2009). Stimulatory role of grape pomace polyphenols on *Lactobacillus acidophilus* growth. *International journal of food microbiology*. 136(1). 119-122.
- Hildebrandt, M. A., Hoffmann, C., Sherrill-Mix, S. A., Keilbaugh, S. A., Hamady, M., Chen, Y. Y., Knight, R., Ahima, R. S., Bushman, F., Wu, G. D. (2009). High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. *Gastroenterology*. 137(5). 1716-1724.
- Hollman, P. C. H., Arts, I. C. W. (2000). Flavonols, flavones and flavanols—nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80(7). 1081-1093.
- Hollman, P. C. H., Bijman, M. N. C. P., van Gameren, Y., Cnossen, E. P. J., de Vries, J. H. M., Katan, M. B. (1999). The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free radical research*. 31(6). 569-573.



- Hollman, P. C. H., van Trijp, J. M. P., Buysman, M. N. C. P., vd Gaag, M. S., Mengelers, M. J. B., de Vries, J. H. M., Katan, M. B. (1997). Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS letters*. 418(1). 152-156.
- Hong, H., Liang, X., Liu, D. (2009). Assessment of benzoic acid levels in milk in China. *Food Control*. 20(4). 414-418.
- Huber, B., Eberl, L., Feucht, W., & Polster, J. (2003). Influence of polyphenols on bacterial biofilm formation and quorum-sensing. *Zeitschrift für naturforschung c*. 58(11/12). 879-884.
- Isolauri, E., Sütas, Y., Kankaanpää, P., Arvilommi, H., Salminen, S. (2001). Probiotics: effects on immunity. *The American journal of clinical nutrition*. 73(2). 444s-450s.
- Jacobson, E. A., Newmark, H., Baptista, J., Bruce, W. R. (1983). A preliminary investigation of the metabolism of dietary phenolics in humans [Urinary metabolites of caffeic and ferulic acid]. *Nutrition reports international*.
- Jang, M., Cai, L., Udeani, G. O., Slowing, K. V., Thomas, C. F., Beecher, C. W. W., Fong, H. H. S., Farnsworth, N. R., Kinghorn, A. D., Mehta, R. G. (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*. 275(5297). 218-220.
- Jankovic, I., Ventura, M., Meylan, V., Rouvet, M., Elli, M., Zink, R. (2003). Contribution of aggregation-promoting factor to maintenance of cell shape in *Lactobacillus gasseri* 4B2. *Journal of bacteriology*. 185(11). 3288-3296.
- Jensen, H., Grimmer, S., Naterstad, K., Axelsson, L. (2012). *In vitro* testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. *International journal of food microbiology*. 153(1). 216-222.
- Jiménez, J. P., Serrano, J., Taberner, M., Arranz, S., Díaz-Rubio, M. E., García-Diz, L., Goñi, I., Saura-Calixto, F. (2008). Effects of grape antioxidant dietary fiber in cardiovascular disease risk factors. *Nutrition*. 24(7). 646-653.
- Johnson, S. (2009). Recurrent *Clostridium difficile* infection: a review of risk factors, treatments, and outcomes. *Journal of Infection*. 58(6). 403-410.

- Johnston, B. C., Goldenberg, J. Z., Vandvik, P. O., Sun, X., Guyatt, G. H. (2011). Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea. *Cochrane Database Syst Rev.* 11.
- Juneja, V. K., Sofos, J. N. (2010). *Pathogens and toxins in foods: challenges and interventions*: ASM Press.
- Justesen, U., Knuthsen, P., Leth, T. (1998). Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A.* 799(1). 101-110.
- Karakaya, S., Kavas, A. (1999). Antimutagenic activities of some foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 79(2). 237-242.
- Kleeman, E. G., Klaenhammer, T. R. (1982). Adherence of *Lactobacillus* Species to Human Fetal Intestinal Cells. *Journal of dairy science.* 65(11). 2063-2069.
- Kokešová, M. A. (2009). *Imunomodulační účinky probiotik v klinické praxi*. Pediatrie pro praxi. Olomouc. Solen. 210.
- Koutsos, A., Lima, M., Fava, F., Conterno, L., Lovegrove, J. A., Viola, R., Tuohy, K. (2014). Apples increased the *bifidobacteria* population in human in vitro colonic gut model—preliminary results. *Proceedings of the Nutrition Society.* 73(OCE1). E25.
- Kroon, P. A., Faulds, C. B., Ryden, P., Williamson, G. (1996). Solubilisation of ferulic acid from plant cell wall materials in a model human gut system. *Biochemical Society Transactions.* 24(3). 384S.
- Kulp, K. S., Fortson, S. L., Knize, M. G., Felton, J. S. (2003). An *in vitro* model system to predict the bioaccessibility of heterocyclic amines from a cooked meat matrix. *Food and Chemical Toxicology.* 41(12). 1701-1710.
- Lafay, S., Gil-Izquierdo, A. (2008). Bioavailability of phenolic acids. *Phytochemistry Reviews.* 7(2). 301-311.
- Lafay, S., Gil-Izquierdo, A., Manach, C., Morand, C., Besson, C., Scalbert, A. (2006). Chlorogenic acid is absorbed in its intact form in the stomach of rats. *The Journal of nutrition.* 136(5). 1192-1197.

- Lahtinen, S. J., Forssten, S., Aakko, J., Granlund, L., Rautonen, N., Salminen, S., Viitanen, M., Ouwehand, A. C. (2012). Probiotic cheese containing *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Lactobacillus acidophilus* NCFM modifies subpopulations of fecal *lactobacilli* and *Clostridium difficile* in the elderly. *Age*, 34(1), 133-143.
- Laparra, J. M., Sanz, Y. (2009). Comparison of *in vitro* models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelium. *Letters in Applied Microbiology*. 49(6). 695-701.
- Lapidot, T., Harel, S., Granit, R., Kanner, J. (1998). Bioavailability of red wine anthocyanins as detected in human urine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46(10). 4297-4302.
- Lata, J., Juránková, J., Příbramská, V. (2009). Intestinal microflora and bacterial translocation. *news and current affairs*. 82(4). 262.
- Laurent, C., Besançon, P., Caporiccio, B. (2007). Flavonoids from a grape seed extract interact with digestive secretions and intestinal cells as assessed in an *in vitro* digestion/Caco-2 cell culture model. *Food Chemistry*. 100(4). 1704-1712.
- Lee, M.-J., Wang, Z.-Y., Li, H., Chen, L., Sun, Y., Gobbo, S., Balentine, D. A., Yang, C. S. (1995). Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 4(4). 393-399.
- Lesuffleur, T., Barbat, A., Dussaulx, E., Zweibaum, A. (1990). Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells. *Cancer research*. 50(19). 6334-6343.
- Leteurtre, E., Gouyer, V., Rousseau, K., Moreau, O., Barbat, A., Swallow, D., Huet, G., Lesuffleur, T. (2004). Differential mucin expression in colon carcinoma HT-29 clones with variable resistance to 5-fluorouracil and methotrexate. *Biology of the Cell*. 96(2). 145-151.
- Liong, M.-T. (2008). Roles of probiotics and prebiotics in colon cancer prevention: Postulated mechanisms and *in vivo* evidence. *International journal of molecular sciences*. 9(5). 854-863.
- Liu, Y., Black, M. A., Caron, L., Camesano, T. A. (2006). Role of cranberry juice on molecular-scale surface characteristics and adhesion behavior of *Escherichia coli*. *Biotechnology and bioengineering*. 93(2). 297-305.

- Lu, L. J. W., Grady, J. J., Marshall, M. V., Ramanujam, V. M. S., Anderson, K. E. (1995). Altered time course of urinary daidzein and genistein excretion during chronic soya diet in healthy male subjects.
- Macheix, J.-J., Fleuriet, A. (1990). Fruit phenolics: CRC press.
- Mack, D. R., Ahrné, S., Hyde, L., Wei, S., Hollingsworth, M. A. (2003). Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells *in vitro*. *Gut*. 52(6). 827-833.
- Makino, H., Martin, R., Ishikawa, E., Gawad, A., Kubota, H., Sakai, T., Oishi, K., Tanaka, R., Ben-Amor, K., Knol, J. (2015). Multilocus sequence typing of *bifidobacterial* strains from infant's faeces and human milk: are *bifidobacteria* being sustainably shared during breastfeeding? *Beneficial Microbes*. 1-10.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*. 79(5). 727-747.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American journal of clinical nutrition*. 81(1). 230S-242S.
- Marteau, P., Salminen, S. (1997). Demonstration of safety of probiotics. *Demonstration of Nutritional Functionality of Probiotic Foods Newsletter*. 2. 3-8.
- Martin, J. H. (1996). Technical considerations for incorporating *bifidobacteria* and bifidogenic factors into dairy products. *Bulletin FIL IDF*.
- Matsumoto, M., Hamada, S., Ooshima, T. (2003). Molecular analysis of the inhibitory effects of oolong tea polyphenols on glucan-binding domain of recombinant glucosyltransferases from *Streptococcus mutans* MT8148. *FEMS microbiology letters*. 228(1). 73-80.
- Mazza, G., Miniati, E. (1993). Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains: CRC press.
- Miro-Casas, E., Covas, M. I., Fito, M., Farre-Albadalejo, M., Marrugat, J., De La Torre, R. (2003). Tyrosol and hydroxytyrosol are absorbed from moderate and sustained doses of virgin olive oil in humans. *European journal of clinical nutrition*. 57(1). 186-190.
- Mohamadzadeh, M., Olson, S., Kalina, W. V., Ruthel, G., Demmin, G. L., Warfield, K. L., Bavari, S., Klaenhammer, T. R. (2005). *Lactobacilli* activate human dendritic cells

- that skew T cells toward T helper 1 polarization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102(8). 2880-2885.
- Mouly, P. P., Arzouyan, C. R., Gaydou, E. M., Estienne, J. M. (1994). Differentiation of citrus juices by factorial discriminant analysis using liquid chromatography of flavanone glycosides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42(1). 70-79.
- Naczki, M., Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*. 1054(1). 95-111.
- Nakagawa, K., Okuda, S., Miyazawa, T. (1997). Dose-dependent incorporation of tea catechins,(-)-epigallocatechin-3-gallate and (-)-epigallocatechin, into human plasma. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 61(12). 1981-1985.
- Ness, A. R., Powles, J. W. (1997). Fruit and vegetables, and cardiovascular disease: a review. *International Journal of epidemiology*. 26(1). 1-13.
- Ohland, C. L., MacNaughton, W. K. (2010). Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 298(6). G807-G819.
- Ouwehand, A. C., Salminen, S. (2003). *In vitro* adhesion assays for probiotics and their *in vivo* relevance: a review. *Microbial ecology in health and disease*. 15(4). 175-184.
- Ouwehand, A. C., Salminen, S., Isolauri, E. (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 82(1-4). 279-289.
- Ouwehand, A. C., Tuomola, E. M., Tölkö, S., Salminen, S. (2001). Assessment of adhesion properties of novel probiotic strains to human intestinal mucus. *International journal of food microbiology*. 64(1). 119-126.
- Pala, V., Sieri, S., Berrino, F., Vineis, P., Sacerdote, C., Palli, D., Masala, G., Panico, S., Mattiello, A., Tumino, R. (2011). Yogurt consumption and risk of colorectal cancer in the Italian European prospective investigation into cancer and nutrition cohort. *International Journal of Cancer*. 129(11). 2712-2719.
- Palafox-Carlos, H., Ayala-Zavala, J. F., González-Aguilar, G. A. (2011). The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants. *Journal of food science*. 76(1). R6-R15.

- Parkar, S. G., Stevenson, D. E., Skinner, M. A. (2008). The potential influence of fruit polyphenols on colonic microflora and human gut health. *International journal of food microbiology*. 124(3). 295-298.
- Pastene, E., Speisky, H. n., García, A., Moreno, J., Troncoso, M., Figueroa, G. (2010). *In vitro* and *in vivo* effects of apple peel polyphenols against *Helicobacter pylori*. *Journal of agricultural and food chemistry*. 58(12). 7172-7179.
- Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M., Brighenti, F. (2003). Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different *in vitro* assays. *The Journal of nutrition*. 133(9). 2812-2819.
- Pérez-Jiménez, J., Serrano, J., Taberner, M., Arranz, S., Díaz-Rubio, M. E., García-Diz, L., Goñi, I., Saura-Calixto, F. (2009). Bioavailability of phenolic antioxidants associated with dietary fiber: plasma antioxidant capacity after acute and long-term intake in humans. *Plant foods for human nutrition*. 64(2). 102-107.
- Pharmaceutiques, U. d. L. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of nutrition*. 125. 1401-1412.
- Pontier, C., Pachot, J., Botham, R., Lenfant, B., Arnaud, P. (2001). HT29-MTX and Caco-2/TC7 monolayers as predictive models for human intestinal absorption: Role of the mucus layer. *Journal of pharmaceutical sciences*. 90(10). 1608-1619.
- Pot, B. (2008). *Bactéries lactiques: De la Génétique Aux Ferments*.
- Proteggente, A. R., Pannala, A. S., Paganga, G., Buren, L. v., Wagner, E., Wiseman, S., Put, F. v. d., Dacombe, C., Rice-Evans, C. A. (2002). The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free radical research*. 36(2). 217-233.
- Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Hartmann-Schmidlin, S., Kähkönen, M., Heinonen, M., Määttä-Riihinen, K., Oksman-Caldentey, K. M. (2005). Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens. *Journal of applied microbiology*. 98(4). 991-1000.
- Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Meier, C., Kähkönen, M., Heinonen, M., Hopia, A., Oksman-Caldentey, K. M. (2001). Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of applied microbiology*. 90(4). 494-507.

- Rawel, H. M., Kulling, S. E. (2007). Nutritional contribution of coffee, cacao and tea phenolics to human health. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*. 2(4). 399-406.
- Reinli, K., Block, G. (1996). Phytoestrogen content of foods a compendium of literature values. *Nutrition and cancer*. 26(2). 123-148.
- Reynaud, J., Guilet, D., Terreux, R., Lussignol, M., Walchshofer, N. (2005). Isoflavonoids in non-leguminous families: an update. *Natural product reports*. 22(4). 504-515.
- Rice-Evans, C., Miller, N., Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science*. 2(4). 152-159.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M., Pridham, J. B. (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free radical research*. 22(4). 375-383.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine*. 20(7). 933-956.
- Ringel-Kulka, T., Palsson, O. S., Maier, D., Carroll, I., Galanko, J. A., Leyer, G., Ringel, Y. (2011). Probiotic bacteria *Lactobacillus acidophilus* NCFM and *Bifidobacterium lactis* Bi-07 versus placebo for the symptoms of bloating in patients with functional bowel disorders: a double-blind study. *Journal of clinical gastroenterology*. 45(6). 518-525.
- Rodríguez, H., de las Rivas, B., Gómez-Cordovés, C., Munoz, R. (2008). Degradation of tannic acid by cell-free extracts of *Lactobacillus plantarum*. *Food chemistry*. 107(2). 664-670.
- Rolfe, R. D. (2000). The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *The Journal of Nutrition*. 130(2). 396S-402S.
- Rouseff, R. L., Martin, S. F., Youtsey, C. O. (1987). Quantitative survey of narirutin, naringin, hesperidin, and neohesperidin in citrus. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 35(6). 1027-1030.
- Ryan, D., Robards, K., Lavee, S. (1999). Determination of phenolic compounds in olives by reversed-phase chromatography and mass spectrometry. *Journal of chromatography A*. 832(1). 87-96.

- Santos-Buelga, C., Scalbert, A. (2000). Proanthocyanidins and tannin-like compounds—nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80(7). 1094-1117.
- Saura-Calixto, F., Serrano, J., Goñi, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*. 101(2). 492-501.
- Scalbert, A., Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of nutrition*. 130(8). 2073S-2085S.
- Schrezenmeir, J., de Vrese, M. (2001). Probiotics, prebiotics, and synbiotics approaching a definition. *The American journal of clinical nutrition*. 73(2). 361s-364s.
- Senok, A. C., Ismael, A. Y., Botta, G. A. (2005). Probiotics: facts and myths. *Clinical Microbiology and Infection*. 11(12). 958-966.
- Serafini, M., Ghiselli, A., Ferro-Luzzi, A. (1996). *In vivo* antioxidant effect of green and black tea in man. *European journal of clinical nutrition*. 50(1). 28-32.
- Shahidi, F. (1997). *Natural antioxidants: chemistry, health effects, and applications*: The American Oil Chemists Society.
- Simons, K., Fuller, S. D. (1985). Cell surface polarity in epithelia. *Annual review of cell biology*. 1(1). 243-288.
- Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermúdez-Humarán, L. G., Gratadoux, J.-J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J.-P., Corthier, G. (2008). *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105(43). 16731-16736.
- Sosulski, F., Krygier, K., Hogge, L. (1982). Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 3. Composition of phenolic acids in cereal and potato flours. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 30(2). 337-340.
- Steinmetz, K. A., Potter, J. D. (1996). Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *Journal of the American Dietetic Association*. 96(10). 1027-1039.
- Subramanian, S., Stacey, G., Yu, O. (2006). Endogenous isoflavones are essential for the establishment of symbiosis between soybean and *Bradyrhizobium japonicum*. *The Plant Journal*. 48(2). 261-273.



- Szeto, Y. T., Tomlinson, B., Benzie, I. F. F. (2002). Total antioxidant and ascorbic acid content of fresh fruits and vegetables: implications for dietary planning and food preservation. *British journal of nutrition*. 87(01). 55-59.
- Švestka, T. (2007). Mikroflóra trávicího traktu a probiotika. *Interní medicína pro praxi*. 389-391.
- Tlaskalová-Hogenová, H., Tučková, L., Lodinová-Žádníková, R., Štěpánková, R., Cukrowska, B., Funda, D. P., Striž, I., Kozáková, H., Trebichavský, I., Sokol, D. (2002). Mucosal immunity: its role in defense and allergy. *International archives of allergy and immunology*. 128(2). 77-89.
- Tomas-Barberan, F. A., Clifford, M. N. (2000). Dietary hydroxybenzoic acid derivatives and their possible role in health protection. *J Sci Food Agric*. 80. 1024-1032.
- Tomas-Barberan, F. A., Clifford, M. N. (2000). Flavanones, chalcones and dihydrochalcones—nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80(7). 1073-1080.
- Tuomola, E. M., Ouwehand, A. C., Salminen, S. J. (2000). Chemical, physical and enzymatic pre-treatments of probiotic *lactobacilli* alter their adhesion to human intestinal mucus glycoproteins. *International journal of food microbiology*. 60(1). 75-81.
- Turnbaugh, P. J., Ridaura, V. K., Faith, J. J., Rey, F. E., Knight, R., Gordon, J. I. (2009). The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Science translational medicine*. 1(6). 6ra14-16ra14.
- Van Tassell, M. L., Miller, M. J. (2011). *Lactobacillus* adhesion to mucus. *Nutrients*. 3(5). 613-636.
- Vaquero, M. J. R., Alberto, M. R., de Nadra, M. C. M. (2007). Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control*. 18(2). 93-101.
- Veitch, N. C. (2009). Isoflavonoids of the Leguminosae. *Natural product reports*. 26(6). 776-802.
- Velíšek, J. (1999). *Chemie Potravin*. Vol. 1. OSSIS Tábor. 70-71s. ISBN 80-86659-00-3.
- Velíšek, J. (1999). *Chemie potravin* 3. OSSIS Tábor. 368 s. ISBN 80-902391-5-3.

- Votava, M. (2003). Lékařská mikrobiologie speciální. (1). Brno. Neptun. 495 s. ISBN 80-902896-6-5.
- Walter, E., Janich, S., Roessler, B. J., Hilfinger, J. M., Amidon, G. L. (1996). HT29-MTX/Caco-2 cocultures as an *in vitro* model for the intestinal epithelium: *In vitro–in vivo* correlation with permeability data from rats and humans. Journal of pharmaceutical sciences. 85(10). 1070-1076.
- Wang, B., Wei, H., Yuan, J., Li, Q., Li, Y., Li, N., Li, J. (2008). Identification of a surface protein from *Lactobacillus reuteri* JCM1081 that adheres to porcine gastric mucin and human enterocyte-like HT-29 cells. Current microbiology. 57(1). 33-38.
- Wang, X., Rochon, M., Lamprokostopoulou, A., Lünsdorf, H., Nimtz, M., Römling, U. (2006). Impact of biofilm matrix components on interaction of commensal *Escherichia coli* with the gastrointestinal cell line HT-29. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS. 63(19-20). 2352-2363.
- Wargovich, M. J. (2000). Anticancer properties of fruits and vegetables. HortScience. 35(4). 573-575.
- Williams, N. T. (2010). Probiotics. American Journal of Health-System Pharmacy. 67(6). 449-458.
- Winkel, B. S. (2006). The biosynthesis of flavonoids. In the science of flavonoids. 71-95.
- Woods, R. K., Walters, E. H., Raven, J. M., Wolfe, R., Ireland, P. D., Thien, F. C. K., Abramson, M. J. (2003). Food and nutrient intakes and asthma risk in young adults. The American journal of clinical nutrition. 78(3). 414-421.
- World Health, O. (2003). Fruit and Vegetable Promotion Initiative: A Meeting Report: 25-27/08/03: World Health Organization.
- World Health, O. (2009). Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks: World Health Organization.
- Wu, G. D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y.-Y., Keilbaugh, S. A., Bewtra, M., Knights, D., Walters, W. A., Knight, R. (2011). Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. Science. 334(6052). 105-108.

- Xu, X., Wang, H.-J., Murphy, P. A., Cook, L., Hendrich, S. (1994). Daidzein is a more bioavailable soymilk isoflavone than is genistein in adult women. Human bioavailability and health protective effects of soy isoflavones. 26.
- Yang, C. S., Wang, Z.-Y. (1993). Tea and cancer. Journal of the National Cancer Institute. 85(13). 1038-1049.
- Yee, S. (1997). *In vitro* permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict *in vivo* (small intestinal) absorption in man-fact or myth. Pharmaceutical research. 14(6). 763-766.
- Young, J. F., Nielsen, S. E., Haraldsdóttir, J., Daneshvar, B., Lauridsen, S. T., Knuthsen, P., Crozier, A., Sandström, B., Dragsted, L. O. (1999). Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status. The American journal of clinical nutrition. 69(1). 87-94.
- Yu, L. C.-H., Wang, J.-T., Wei, S.-C., Ni, Y.-H. (2012). Host-microbial interactions and regulation of intestinal epithelial barrier function: from physiology to pathology. World journal of gastrointestinal pathophysiology. 3(1). 27.
- Zavaglia, A. G., De Urza, P., De Antoni, G. (2000). Characterization of *Bifidobacterium* strains using box primers. Anaerobe. 6(3). 169-177.
- Zimmer, J., Lange, B., Frick, J.-S., Sauer, H., Zimmermann, K., Schwartz, A., Rusch, K., Klosterhalfen, S., Enck, P. (2011). A vegan or vegetarian diet substantially alters the human colonic faecal microbiota. European journal of clinical nutrition. 66(1). 53-60.

## 9. Seznam použitých zkratek

CFU	colony-forming unit
CZ	Česká republika
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
FAO	Food and Agriculture Organization; Organizace pro výživu a zemědělství
FBS	fetální bovinní sérum
FRAP	ferric reducing-antioxidant power
IgA	imunoglobulin A
LM	laterální membrána
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MTX	methotrexát
MUC	geny kódující membránové proteiny z řady mucinů
MV	mikroklky
PBS	fosfátový pufr
TEAC	Trolox ekvivalent antioxidační kapacity
TJ	těsný spoj
UK	Spojené království
WHO	World Health Organization; Světová zdravotnická organizace

## 10. Seznam použitých obrázků, tabulek a grafů

Obr. 1: Vliv probiotických bakterií a kvasinek na bariérní funkci střevního epitelu .....	10
Obr. 2: Tenké střevo a jeho absorpce .....	13
Obr. 3: Caco-2 buňky .....	17
Obr. 4: Chemické struktury vybraných rostlinných fenolových sloučenin .....	20
Obr. 5: Chemická struktura flavonoidů .....	23
Obr. 6: Vazebná místa pro kovy v molekulách flavonoidů .....	29
Obr. 7: Vznik fenoxylového radikálu a chinoidní struktury .....	30
Obr. 8: Obecná lidská bioabsorpce fenolových sloučenin obsažených v nápojích nebo potravinách chudých na vlákninu. ....	31
Tab. 1: Složení gastrointestinálního traktu dospělého člověka .....	8
Tab. 2: Vliv výživy na střevní mikroflóru .....	11
Tab. 3: Zdroj rostlinných fenolových látek .....	25
Tab. 4: Biologická dostupnost rostlinných fenolových látek v lidském těle .....	28
Tab. 5: Výsledky adherence .....	35
Graf 1: Výsledky adherence .....	36