

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Vliv jablečných polyfenolů na adherenci vybraných probiotických kmenů k buňkám střevní mukózy**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Jana Růžičková**

**Obor studia: Výživa a potraviny**

**Vedoucí práce: doc. Ing. Lenka Kouřimská, Ph.D.**

© 2017 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv jablečných polyfenolů na adherenci vybraných probiotických kmenů k buňkám střevní mukózy" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucí diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 13. 4. 2017

---

### **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Lence Kouřimské, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce, věcné připomínky a podněty k vypracování. Mé poděkování patří také Ing. Tereze Volšátové za pomoc a cenné rady při vypracování této práce a za dílčí záležitosti spojené s praktickou částí. Oběma bych chtěla poděkovat za trpělivost, ochotu a čas, který mi věnovaly.

# Vliv jablečných polyfenolů na adherenci vybraných probiotických kmenů k buňkám střevní mukózy

## Souhrn

Diplomová práce se zabývá vlivem jablečných polyfenolů na adherenci vybraných probiotických kmenů k buňkám střevní mukózy. V literární rešerši jsou sumarizovány současné poznatky související s mikrobiální adharencí v lidském střevě, významem jablek ve výživě člověka a interakcí mikroorganismů s jablečnými polyfenoly. Dále jsou v práci charakterizovány jednotlivé polyfenoly, které se nejčastěji vyskytují v jablkách, popsán jejich zdravotní přínos a možné interakce s mikroorganismy v lidském trávicím traktu.

V mnoha studiích zabývajících se mikrobiální adharencí je pozitivní působení na zdraví hostitele přisuzováno právě polyfenolům. Pro potvrzení hypotézy vlivu jablečných polyfenolů na adharenční schopnosti probiotických kmenů laktobacilů *in vitro* byla stanovena adharence dvou bakteriálních kmenů *Lactobacillus gasseri* R a *Lactobacillus casei* FMP na směsné kultuře Caco-2 a HT29-MTX buněčných linií po přidavku jablečných extraktů ze slupky a dužiny. Obdobným způsobem byla stanovena adharence po přidavku čtyř nejčteněji zastoupených polyfenolů v jablkách v koncentraci 20 µg/ml. Následně pro komplexnější objasnění vztahu mezi polyfenoly a střevní mikrobiotou bylo provedeno stanovení adharence pro devět polyfenolů v koncentracích 2,5–45 µg/ml. Téměř všechny polyfenoly významně zvýšily přilnavost u obou kmenů *L. gasseri* R a *L. casei* FMP. Před vlastním testem adharence byly zvoleny vhodné koncentrace vybraných polyfenolů na základě stanovení životaschopnosti buněk pomocí testu cytotoxicity.

Bylo zjištěno, že jablečné polyfenoly, které jsou obsaženy především v jablečné slupce, mohou zvyšovat schopnost adharence bakteriálních probiotických kmenů *Lactobacillus* spp. k buňkám střevní mukózy. Tímto působením mohou ovlivňovat složení střevní mikrobioty. Z výsledků vyplývá, že konzumace jablek s vysokým obsahem polyfenolů může pomoci udržovat mikrobiální rovnováhu intestinálního prostředí a přispívat ke zdraví hostitele.

**Klíčová slova:** jablečné polyfenoly, adharence, laktobacily, Caco-2, HT29-MTX.

# The effect of apple polyphenols on the adherence of selected probiotic strains to the intestinal mucosa

## Summary

The thesis deals with the effect of apple polyphenols on the adherence of selected probiotic strains to the intestinal mucosa. The literature review summarizes the current knowledge related to microbial adherence in the human gut, the importance of apples in human nutrition and microbial interactions with apple polyphenols. Furthermore, there are characterized and described individual polyphenols which are most frequently found in apples, their health benefits and possible interactions with microorganisms in the human gastrointestinal tract.

In several studies of microbial adherence, the positive effect on the host health being attributed to the polyphenols. To confirm whether the apple polyphenols affect the ability of adherence of probiotic lactobacilli strains *in vitro* was determined the adherence assay of two bacterial strains of *Lactobacillus gasseri* R and *Lactobacillus casei* FMP based on co-culture Caco-2 and HT29-MTX cell lines after addition of apple extracts. Correspondingly, the adherence assay was also determined after the addition of four the most frequently present polyphenols in apples at a concentration of 20 µg/ml. In order to clarify associations between intestinal microbiota and polyphenols, an adherence ability assay for nine polyphenols was evaluated in the range of concentrations 2,5–45 µg/ml. Almost all of polyphenols significantly increased the adhesion of both *L. gasseri* R and *L. casei* FMP strains. Prior to the adherence assay, appropriate concentrations of polyphenols were selected based on cytotoxicity screenings.

It has been found that apple polyphenols which are presented mainly in apple peel may enhance the ability of bacterial adherence of probiotic *Lactobacilli* strains to the cells of the intestinal mucosa. This effect may affect the composition of the intestinal microbiota. It suggests that consumption of apples with a high content of polyphenols may help to maintain the microbial balance of the intestinal environment and contribute to the host health.

**Keywords:** apple polyphenols, adherence, lactobacilli, Caco-2, HT-29 MTX.

# Obsah

<b>1 Úvod.....</b>	<b>8</b>
<b>2 Cíl práce .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1 Hypotéza.....</b>	<b>9</b>
<b>3 Literární rešerše .....</b>	<b>10</b>
<b>3.1 Mikrobiální adherence v lidském střevě .....</b>	<b>10</b>
3.1.1 Mikrobiota trávicího traktu .....	11
3.1.2 Role laktobacilů .....	12
3.1.3 Mukóza a muciny.....	14
3.1.4 <i>In vitro</i> modely mikrobiální adherence.....	15
<b>3.2 Význam jablek ve výživě člověka.....</b>	<b>16</b>
3.2.1 Zastoupení polyfenolů v jablkách.....	16
3.2.1.1 Epikatechin gallát .....	18
3.2.1.2 Floretin .....	19
3.2.1.3 Chlorogenová kyselina .....	19
3.2.1.4 Isokvercitrin.....	20
3.2.1.5 Katechin.....	21
3.2.1.6 Kvercetin .....	21
3.2.1.7 Prokyanidin B2.....	22
3.2.1.8 Rutin .....	22
3.2.1.9 Taxifolin .....	23
<b>3.3 Interakce mikroorganismů s jablečnými polyfenoly .....</b>	<b>24</b>
<b>4 Materiál a metody .....</b>	<b>27</b>
<b>4.1 Materiál.....</b>	<b>27</b>
<b>4.2 Metody.....</b>	<b>27</b>

4.2.1	Bakteriální kmeny a podmínky kultivace .....	27
4.2.2	IC <sub>50</sub> test inhibiční koncentrace .....	28
4.2.3	Příprava jablečných extraktů a polyfenolů .....	28
4.2.4	Buněčné kultury .....	29
4.2.5	Stanovení adherence .....	29
4.2.6	Statistická analýza.....	29
<b>5</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>31</b>
<b>6</b>	<b>Diskuse .....</b>	<b>36</b>
<b>7</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>39</b>
<b>8</b>	<b>Seznam literatury .....</b>	<b>40</b>
<b>9</b>	<b>Seznam použitých zkratk.....</b>	<b>47</b>

# 1 Úvod

Jablka jsou rozšířeným ovocným druhem a ve výživě člověka, stejně jako celá řada dalších potravin rostlinného původu, jsou významná pro svůj bohatý fytochemický profil. Jsou také zdrojem vlákniny, která slouží jako substrát pro střevní mikrobiotu. Koncentrace polyfenolů je ve slupce jablek mnohem vyšší než v dužině a patrně díky těmto biologicky aktivním látkám mají jablka potenciál ovlivnit zdraví lidí, kteří je konzumují. Navíc jsou dobře dostupná a lze je konzumovat během celého roku.

Jablečné polyfenoly mohou interagovat se střevní mikrobiotou. Jde o obousměrnou interakci. Střevní mikrobiota přeměňuje polyfenoly na jejich metabolity, které mohou vykazovat odlišnou biologickou aktivitu a dostupnost ve srovnání s prvotní sloučeninou. Naopak polyfenoly mohou měnit složení střevní mikrobioty například inhibicí růstu patogenů nebo stimulací růstu symbiotických bakterií. Fenolické sloučeniny mohou přispívat k rovnováze střevní mikrobioty, mohou působit prebioticky a přispívat tak k pozitivnímu působení na zdraví člověka, jako hostitele střevní mikrobioty.

Bylo prokázáno, že strava může významně ovlivnit metabolismus polyfenolů, ale i osídlení střevní stěny bakteriemi. Vychýlení střevní mikrobioty z rovnováhy může být zlepšeno užíváním probiotických doplňků. Protože je mikrobiální adherence základní podmínkou ke kolonizaci intestinálního traktu, může zvýšení adherence potencionálně probiotických bakteriálních kmenů ke střevní sliznici vést k příznivé změně složení a udržení rovnováhy střevní mikrobioty. To, zda jablečné polyfenoly ovlivňují aderenční schopnosti probiotických kmenů laktobacilů, je možné potvrdit pomocí *in vitro* testů, které simulují přirozené prostředí lidského trávicího traktu. K těmto účelům jsou často používány Caco-2 a HT29-MTX buňky, protože nejlépe odpovídají podmínkám *in vivo*. Výpovědní hodnota *in vivo* testů je v porovnání s testy *in vitro* o něco vyšší, jsou ale velmi náročné na provedení.



## **2 Cíl práce**

Cílem diplomové práce je zpracování literární rešerše zaměřené na současné poznatky souvisejícími s obsahem polyfenolů v jablkách, jejich zdravotním přínosem a možnými interakcemi s mikroorganismy v lidském trávicím traktu. V praktické části bude cílem ověřit, zda jablečné polyfenoly ovlivňují adhezní schopnosti probiotických kmenů laktobacilů v *in vitro* modelu trávicího traktu na Caco-2 a HT29-MTX buněčných liniích.

### **2.1 Hypotéza**

Některé frakce jablečných polyfenolů zvyšují adhezní schopnosti vybraných probiotických kmenů na stěnu střevního epitelu.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Mikrobiální adherence v lidském střevě

Mikrobiální adherence k intestinální mukóze lidského střeva je nezbytným předpokladem kolonizace trávicího traktu příslušnými mikroorganismy (Bustos et al., 2012). Adherenční vlastnosti se dají hodnotit na základě hydrofobnosti a schopnosti mikroorganismů adherovat k epitelovým buňkám. Adherence bakterií na epitelové buňky a povrchy sliznic je klíčovým kritériem pro výběr probiotika (Duary et al., 2011). V případě probiotických kmenů je adherence úzce spojována s jejich schopností pozitivně působit na zdraví hostitele, tudíž zvýšení adherence probiotických bakterií může pomoci obnovit rovnováhu střevní mikrobioty hostitele (Bustos et al., 2012).

Mechanismus mikrobiální adherence k intestinálnímu povrchu spočívá v tvorbě specifických vazeb mezi bakteriálními adheziny a receptory na povrchu tkání. Tato interakce je nejspíše ovlivněna složením a strukturou bakterií a interagujícího povrchu. Mezi bakteriemi a střevní stěnou však může vznikat i nespecifická hydrofobní interakce. Povrchová hydrofobnost podmiňuje fyzikálně-chemické vlastnosti povrchu bakterií. Hydrofobní interakce jsou řízeny přitažlivými silami mezi nepolárními povrchy ve vodě rozpuštěných látek. Schopnost adherence bifidobakterií k buňkám Caco-2 *in vitro* se projevila jako interakce nezávislá na povrchové hydrofobnosti, ale jako kmen-specifická interakce, protože se výrazně lišila mezi jednotlivými zkoumanými kmeny (Pan et al., 2006). V další studii pak schopnost bakteriální adherence k lidským střevním buňkám odhalila významné rozdíly mezi různými bakteriálními druhy a kmeny (Jensen et al., 2012).

Kmeny *Lactobacillus*, které byly izolovány z lidských fekálních vzorků, prokázaly lepší hydrofobnost a schopnost přilnout k epitelovým buňkám v podmínkách *in vitro* ve srovnání s kmenem izolovaným ze vzorku sýru. Tyto vlastnosti zlepšující kolonizaci střeva naznačují, že by mohlo jít o vhodné probiotické kmeny. I když testování adherence *in vitro* přesně neodpovídá podmínkám *in vivo*, mohou být poznatky získané touto cestou cenné pro určení vhodných potencionálních probiotik. Jejich účinnost u člověka je však nutné ověřit v dalších klinických studiích (Duary et al., 2011).

Vzhledem k tomu, že je adherence nezbytná pro zahájení interakce mezi hostitelem a patogenem, je prevence přilnavosti patogenních bakterií na epitelové buňky gastrointestinálního traktu účinnou strategií pro snížení rizika onemocnění způsobených patogeny přenášenými potravinami. Jde o kompetitivní inhibici (Xu et al., 2009).

Vyjádření mikrobiální adherence je dáno jako procento přichycených bakterií ve srovnání s celkovým množstvím bakterií přidaných k médiu nebo jako procento radioaktivity naměřené po adherenci ve srovnání s radioaktivitou přidané mikrobiální suspenze, v případě použití radioaktivně značených bakterií (Kadlec et al., 2011).

### 3.1.1 Mikrobiota trávicího traktu

Střevní mikrobiotu obývající lidská střeva tvoří velké množství mikroorganismů s více než 500 druhy bakterií. Bakterie zastupují více než 99 % střevní mikrobioty a lze je rozdělit do 4 hlavních skupin: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* a *Actinobacteria*. Hustota osídlení bakteriemi se zvyšuje od tenkého střeva a dosahuje koncentrací od  $10^9$  do  $10^{14}$  KTJ/ml v tlustém střevě (Ojetti et al., 2009). Mikrobiota vykonává důležité metabolické a imunitní funkce s výrazným účinkem na nutriční a zdravotní stav hostitele (Laparra and Sanz, 2010).

Střevní mikrobiota má důležitou úlohu v metabolismu chemických sloučenin přijatých z potravy. Bakteriální metabolity jsou odlišné od těch, které mohou být tvořeny lidskými enzymy a jejich dopad na zdraví hostitele a na střevní mikrobiotu se tak liší. Je tomu tak, protože bakteriální procesy probíhají za anaerobních podmínek a jsou založeny zejména na reakcích redukce a/nebo hydrolýzy, za vzniku nepolárních produktů o nízké molekulové hmotnosti (Duda-Chodak et al., 2015).

Na kontrole stability střevní mikrobioty se podílí mnoho faktorů, jako jsou střevní pH, teplota, mikrobiální interakce, peristaltika, žlučové kyseliny, farmakoterapie a imunitní odezvy. Nerovnováha střevní mikrobioty může nastat v případě, když tyto mechanismy selžou. To vede k nástupu jak mimostřevních (infekčních a alergických), tak i střevních (infekčních, zánětlivých, autoimunitních a neoplastických) onemocnění (Ojetti et al., 2009). Může se stát, že konzumace průmyslově zpracovaných potravin, rozšířené používání antibiotik a dezinfekčních prostředků a moderní životní styl mohou navždy změnit dávnou podobu střevního mikrobiomu. Možná nikdy nebude možné identifikovat nebo obnovit lidský mikrobiom do původního stavu, ale dietní modulací lze manipulovat určité druhy nebo skupiny druhů střevní mikrobioty, což může nabídnout nové terapeutické přístupy k současným problémům, jako jsou funkční poruchy zažívacího traktu, obezita a možná dokonce s věkem související podvýživa (Jeffery and O'Toole, 2012).

Rovnováha mezi hostitelským imunitním systémem a komenzální mikrobiotou střeva je rozhodující pro udržení zdraví, vzhledem k tomu, že etiologie mnoha nemocí značně koreluje

se střevní mikrobiotou. Změny intestinální mikrobioty a jejich důsledky mohou souviset s výživou a věkem (Duda-Chodak et al., 2015).

Bioaktivní složky potravy mají významný vliv na střevní prostředí, modulaci složení střevní mikrobioty a pravděpodobně i na její funkční účinky na savčích tkáních. Potrava hraje prospěšnou roli přesahující základní výživu, což vede k vývoji funkčních potravin a nutraceutik. Metabolity a účinky složek funkčních potravin mohou záviset na střevní mikrobiotě a dokonce se mohou měnit od jedince k jedinci (Laparra and Sanz, 2010).

Nestrávené složky potravy se dostávají do vzdálenějších segmentů gastrointestinálního traktu a interagují zde se střevní mikrobiotou. Bakterie využívají tyto látky prostřednictvím vlastních enzymů jako zdroj energie a živin. Mnohé z těchto enzymů mají antibakteriální vlastnosti, což umožňuje eliminaci patogenů, ale může také dojít k eliminaci prospěšné střevní mikrobioty (Duda-Chodak et al. 2015).

Mezi nejlépe charakterizované bioaktivní látky patří prebiotika, polyenové mastné kyseliny a fytochemikálie. Prebiotika mohou ovlivňovat složení střevní mikrobioty a její schopnost vytvářet produkty fermentace (mastné kyseliny s krátkým řetězcem) s různorodými biologickými úlohami. Polyenové mastné kyseliny zahrnují omega-3 a omega-6 mastné kyseliny, jejichž rovnováha může ovlivnit různé aspekty imunity a metabolismu. Interakce mezi polyenovými mastnými kyselinami a střevní mikrobiotou také může ovlivnit jejich biologické role. Fytochemikálie jsou bioaktivní rostlinné látky s potenciálními antioxidantními, antiestrogenními, protizánětlivými, imunomodulačními a protirakovinnými účinky. Nicméně, biologická dostupnost a účinky polyfenolů velmi závisí na jejich transformaci střevní mikrobiotou. Fytochemikálie a jejich metabolické produkty mohou také inhibovat patogenní bakterie při stimulaci růstu prospěšných bakterií, za vývoje účinků podobných těm prebiotickým (Laparra and Sanz, 2010).

Polyfenoly a jejich metabolity přispívají k udržení zdraví gastrointestinálního traktu interakcí s epiteliálními buňkami a modulací složení střevní mikrobioty. Polyfenoly mohou působit jako podpůrné faktory pro růst, proliferaci nebo přežití prospěšných střevních bakterií, především kmene *Lactobacillus*, a tím působí prebioticky a zabraňují množení některých patogenních bakterií, jako jsou druhy *Salmonella* a *Helicobacter pylori* (Hervert-Hernandez and Goni, 2011).

### **3.1.2 Role laktobacilů**

Laktobacily patří do bakteriálního rodu *Lactobacillus*, taxonomicky komplexního a složeného z více než 170 druhů, které nelze snadno rozlišit a fenotypově často vyžadují

molekulární identifikaci (Goldstein et al., 2015). Jedná se o grampozitivní, anaerobní, mikroaerofilní tyčinky, které netvoří spóry a jsou katalasa negativní. Tyto bakterie mléčného kvašení, jsou funkční skupinou mikroorganismů, které produkují kyselinu mléčnou jako hlavní metabolický konečný produkt fermentace cukrů (Salvetti et al., 2012). Laktobacily jsou součástí normální lidské gastrointestinální a vaginální flóry, ale mohou být také příležitostně lidskými patogeny. Jsou značně používány v mnoha komerčních produktech (Goldstein et al., 2015). Mnoho kmenů laktobacilů patří mezi nejdůležitější bakterie v mikrobiologii potravin a v lidské výživě, vzhledem k jejich přínosu při produkci fermentovaných potravin nebo jejich použití jako probiotika (Salvetti et al., 2012).

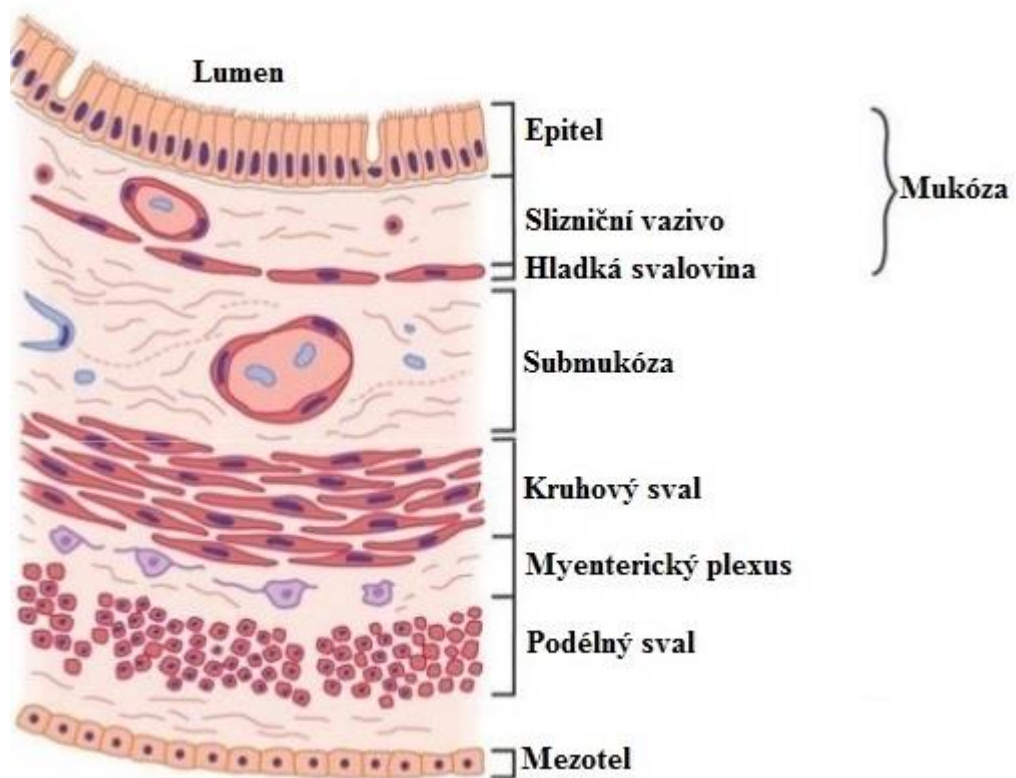
Probiotika jsou definována jako živé mikroorganismy, které jsou-li podávány v adekvátním množství, přispívají ke zlepšení zdravotního stavu hostitele. Mikroorganismy, které mají být považovány za probiotika, musí splňovat několik kritérií. Druh, z kterého jsou izolovány, by měl být stejný, jako je druh zamýšleného hostitele. Měly by mít prokazatelný příznivý vliv na hostitele. Musí být nepatogenní, netoxické a bez významných nepříznivých vedlejších účinků. Dalším kritériem je schopnost přežít v gastrointestinálním traktu. Probiotika by měla být stabilní v průběhu zamýšlené životnosti a skladovatelnosti výrobku a měla by obsahovat dostatečný počet životaschopných buněk pro zajištění zdravotního přínosu. Dále by měla být kompatibilní s formátem výrobků pro udržení požadovaných sensorických vlastností a měla by být správně označena (FAO/WHO, 2002).

Probiotika mají potenciální léčebné a preventivní zdravotní benefity. Jejich zdravotní přínos však musí být podložen studiemi. Je nutné, aby probiotika byla identifikována na úrovni kmene. Musí být charakterizovány specifické účinky na zdraví a v probiotických produktech musí být použity pouze účinné a bezpečné kmeny a dávky (Sanders, 2008). Probiotika pomáhají udržovat obranyschopnost střevní sliznice modifikací podmínek prostředí, soutěžením o živiny a adhezni místa, produkcí antimikrobiálních metabolitů a modulací imunitních i neimunních obranných mechanismů hostitele (Bustos et al., 2012).

Potencionálně nová probiotika by podle FAO/WHO (2002) měla mít tyto funkční vlastnosti: být rezistentní k žaludeční kyselosti a k žlučovým kyselinám, adherovat na mukózní povrch a/nebo střevní epitel a buněčné linie a zároveň mít schopnost snížit adhezenci patogenů k povrchům, vykazovat antimikrobiální aktivitu proti potenciálně patogenním bakteriím a v případě probiotik pro vaginální použití musí být odolná proti spermicidům.

### 3.1.3 Mukóza a muciny

Střevní mukóza (Obr. 1) je tvořena intestinálním epitelem, imunitními buňkami a rezidentní mikrobiotou (Kadlec et al., 2011).



Obr. 1 Vrstvy střevní stěny (převzato a upraveno podle Barrett et al. (2009))

Pohárkové buňky na povrchu epitelu produkují mukus, který je neustále obnovován (Grajek and Olejnik, 2004). Vrstva mukusu pokrývá povrch sliznice lidského tlustého střeva. Tento glykoprotein je silně kolonizován bakteriemi, které jsou však odlišné od bakterií nacházejících se v lumenu střeva (Macfarlane et al., 2005). Vrstva mukusu v tlustém střevě má především ochrannou funkci, protože minimalizuje kontakt mezi střevní mikrobiotou a epiteliálními buňkami. V případě porušení této bariéry může dojít k zánětu tlustého střeva (Gustafsson et al., 2012). Další funkcí je ochrana střevní stěny před infekcí, například proti rotavirům, které způsobují průjem u malých dětí (Grajek and Olejnik, 2004). Mukusová vrstva představující fyzikální a chemickou bariéru mezi střevním obsahem a podkladovým epitelem navíc poskytuje preferenční vazebná místa pro patogeny a symbiotické bakterie. Gastrointestinální interakce mezi mukusem a mikrobiotou hrají klíčovou roli v určení výsledných vztahů mezi komenzální i patogenní mikrobiotou a hostitelem (Juge, 2012).

Muciny jsou složky mukusu. Všechny muciny jsou glykoproteiny, které jsou vysoce O-glykosylované (Corfield, 2015). Mají silný negativní povrchový náboj a velkou hydratační kapacitu (Kadlec et al., 2011). Předpokládá se, že muciny obsahují receptory podobající se enterocytům, takže jsou první vrstvou, na kterou bakterie adherují (Grajek and Olejnik, 2004). Poskytují vazebná místa pro mikrobiotu a někdy dokonce obsahují specifické oligosacharidy, na které se váží patogenní bakterie a ty jsou tak imobilizovány. Jsou propustné pro plyny a živiny, které vyměňují s intestinálním epitelem. Usnadňují pasáž tráveniny lubrikačnímu lumenu a zachovávají hydratační vrstvy epitelu (Kadlec et al., 2011). Také se podílejí na ochraně sliznice jako součást obranné bariéry. Interakce mucinů s mikrobiotou hraje důležitou roli v normální funkci gastrointestinálního traktu (Corfield, 2015).

### **3.1.4 *In vitro* modely mikrobiální adherence**

Jednotlivé bakteriální kmeny mají rozdílné schopnosti adherence. Lze je studovat pomocí *in vitro* metod, které umožňují rozlišit různé typy interakcí a molekul důležitých pro zprostředkování interakce mezi mikroorganismem a hostitelem. Stanovení adherence bakterií pomocí *in vitro* modelů se vyhodnocuje buď adhezí k mucinu nebo k buněčným kulturám (Kadlec et al., 2011). Stanovení adherence za použití buněčných kultur je sice o něco složitější, ale má ve výsledcích nižší variabilitu v porovnání s testováním adherence k mucinu. Humánní intestinální epitelální buněčné linie Caco-2 a HT-29 jsou pro tato stanovení často používány, protože dobře simulují intestinální prostředí (Laparra and Sanz, 2009). Přírodním *in vivo* podmínkám však nejlépe odpovídá ko-kultura lidských buněčných kultur tlustého střeva Caco-2 kolorektální adenokarcinom reprezentující enterocyty a HT29-MTX mucin produkující buněčná linie reprezentující pohárkové buňky (Pontier et al., 2001).

Ačkoliv *in vitro* modely mikrobiální adherence mají o něco nižší výpovědní hodnotu než *in vivo* modely, jsou důležité především pro prokázání vztahů příčin a následků před samotným testováním hypotéz na zvířecích modelech a jsou v tomto směru cenným přínosem (Fritz et al., 2013).

## 3.2 Význam jablek ve výživě člověka

Jablka jsou rozšířeným ovocným druhem a ve výživě člověka, stejně jako celá řada dalších potravin rostlinného původu, jsou významná pro svůj bohatý fytochemický profil. Rostoucí konzumace jablek, jablečné šťávy a jablečných produktů naznačuje jejich potenciál ovlivnit zdraví lidí, kteří je konzumují. Měla by být zařazována do jídelníčku jako součást zdravé výživy. U dětí, které konzumovaly jablka, bylo zjištěno nižší riziko obezity a lepší kvalita stravy než u dětí, které jablka nekonzumují (O'Neil et al., 2015). Jablka mohou snížit riziko chronických onemocnění různými mechanismy, zahrnující buněčnou signalizaci, antioxidační a antiproliferační účinky. Dále je konzumace jablek a jablečných produktů spojena s příznivými účinky na rizika, markery a etiologii rakoviny, kardiovaskulární choroby, astma a Alzheimerovu chorobu. Může být také spojena se zlepšenými výsledky souvisejících s úbytkem kognitivních funkcí normálního stárnutí, cukrovkou, regulací váhy, zdravím kostí, funkcí plic a gastrointestinální ochranou (Hyson, 2011).

Jablečné polyfenoly mohou být substráty pro mikrobiotu tlustého střeva. Polyfenoly a jejich metabolity přispívají k udržení gastrointestinálního zdraví, a to především modulací střevní mikrobiální rovnováhy se simultánní inhibicí patogenů a stimulací prospěšných bakterií. Mohou tak působit prebioticky. Prebiotický efekt by mohl být zvýšen, pokud by se podstatné množství polyfenolů spojilo s vlákninou. Proto pravidelná konzumace potravy bohaté na rostlinné potraviny s vysokým obsahem polyfenolů může přispívat k vyvážení střevní mikrobiální ekologie, pomáhat předcházet poruchám zažívacího traktu a tím i zlepšovat zdraví hostitele (Hervert-Hernandez and Goni, 2011).

Bakteriální metabolismus většinou snižuje aktivitu složek potravy, jako jsou polyfenoly. Někdy však specifický produkt bakteriální transformace vykazuje lepší vlastnosti. Některé produkty bakteriální transformace mohou vykazovat zesílené nebo více blahodárné účinky, nebo mohou být degradovány na neaktivní nebo toxické látky (Duda-Chodak et al., 2015).

### 3.2.1 Zastoupení polyfenolů v jablkách

Fenolové sloučeniny se nachází výhradně v rostlinách (Salem Alrawaiq and Abdullah, 2014). Jsou nezbytnou součástí lidské stravy a jsou v popředí zájmu vzhledem k jejich antioxidačním vlastnostem a potenciálním blahodárným účinkům na zdraví. Tyto sloučeniny se vyskytují v různých strukturních formách od jednoduché fenolové molekuly až po komplexní polymery s vysokou molekulovou hmotností (Shahidi and Ambigaipalan, 2015). Rostliny je tvoří jako sekundární metabolity (Noda et al., 2012).



Jablka jsou vynikajícím zdrojem různých fenolových sloučenin a rovněž mají vysokou celkovou antioxidační kapacitu (Shahidi and Ambigaipalan, 2015). Polyfenoly nacházející se v jablkách lze rozdělit na flavonoidy a fenolové kyseliny. Do skupiny fenolových kyselin patří deriváty skořicové kyseliny a deriváty benzoové kyseliny. Flavonoidy zahrnují podtřídy flavonoly, flavan-3-oly, dihydrochalkony a anthokyany (Ondrejovič et al., 2009). Většina flavonoidů, kromě podtřídy flavan-3-olů neboli katechinů, je přítomna v rostlinách ve formě vázané na cukry jako glykosidy (Hollman, 2004). Konjugáty vznikají většinou vazbou s glukosou nebo rhamnosou, ale i s arabinosou, galaktosou a xylosou (Manach et al., 2004).

Podle Tsao et al. (2005) je v jablkách pět hlavních skupin polyfenolických sloučenin zahrnujících hydroxyskořicové kyseliny, flavan-3-oly, anthokyanidiny, flavonoly a dihydrochalkony. V jablečné dužině jsou nejvíce zastoupené hydroxyskořicové kyseliny (chlorogenová kyselina a p-kumaroylchinová kyselina), kyanidin-3-galaktosid, flavan-3-oly (zejména katechin a epikatechin) a prokyanidiny (prokyanidin B1 a B2), flavonoly (kvercetin galaktosid, glukosid, rhamnosid, arabinosid a xylosid) a dihydrochalkony (zejména floridzin a floretin-2'-xyloglukosid). Podle Wolfe et al. (2003) dužina obsahuje katechiny, prokyanidiny, floridzin, floretinové glykosidy, kávovou kyselinu a chlorogenovou kyselinu. Tvrdí, že slupka obsahuje všechny tyto sloučeniny, a navíc ještě některé další flavonoidy, které nebyly nalezeny v dužině, jako jsou kvercetinové glykosidy. V dužině nebyly nalezeny ani anthokyanidy (Tsao et al., 2005). Koncentrace celkových fenolů je ve slupce jablek mnohem větší než v dužině (Burda et al., 1990).

Mezi gastrointestinální mikrobiotou, příjmem a metabolismem biologicky aktivních látek, jako jsou polyfenoly, a buňkami střevní sliznice existuje vzájemný vztah (Bustos et al., 2012). Biologické vlastnosti polyfenolů jsou značně závislé na jejich biologické dostupnosti. Biologická dostupnost polyfenolů je naopak do značné míry ovlivněna jejich stupněm polymerizace. Polyfenoly se dále podílejí na modulaci složení nebo aktivity střevní mikrobiální populace. Účinky polyfenolů z velké části závisí na jejich transformaci střevní mikrobiotou. Střevní mikrobiota hraje klíčovou roli při modulaci produkce, biologické dostupnosti a biologické aktivity fenolických metabolitů. Nejen polyfenoly, ale i jejich mikrobiální metabolity přispívají k ovlivnění zdraví hostitele udržováním rovnováhy střevní mikrobioty prostřednictvím stimulace růstu prospěšných bakterií a inhibicí patogenních bakterií, přičemž vykazují účinky podobné prebiotikům (Cardona et al., 2013).

Polyfenoly, jako součást potravy, by tak měli být pro člověka zdravotním přínosem, protože mohou v lidském organismu působit jako antioxidanty nebo jako protirakovinné,

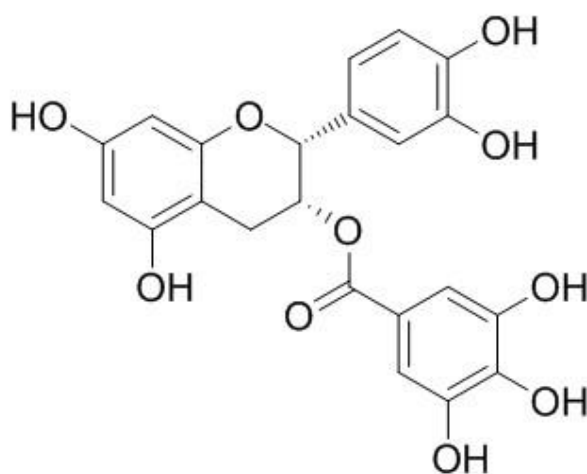
neuroprotektivní, kardiopreventivní, antivirové a antimikrobiální látky (Aron and Kennedy, 2008).

Kromě endogenních faktorů, jako je mikrobiota a trávicí enzymy, může také strava významně ovlivnit přístupnost, absorpci a další metabolismus polyfenolů. Zatímco vláknina, dvojmocné minerály, viskózní strava a strava bohatá na bílkoviny pravděpodobně působí nepříznivě na biologickou dostupnost polyfenolů, stravitelné sacharidy, lipidy a antioxidanty mohou zvýšit biologickou dostupnost polyfenolů (Bohn, 2014).

U několika polyfenolů bylo prokázáno, že inhibují adhezenci střevních patogenů na lidské střevní buněčné linie a zvyšují adhezenci u některých probiotických bakterií, například u *Lactobacillus rhamnosus*. Konzumace ovoce a zeleniny obsahující tyto polyfenoly, má potenciál ovlivnit střevní mikrobiotu a zlepšit střevní mikrobiální nerovnováhu způsobenou stresem a dalšími faktory, a tím podporovat zdraví (Parkar et al., 2008).

### 3.2.1.1 Epikatechin gallát

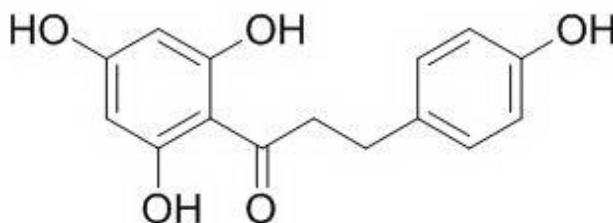
Epikatechin gallát (Obr. 2) je flavonoid patřící do skupiny flavan-3-olů. Ze všech katechinů zeleného čaje měl nejsilnější inhibiční účinek na buněčné linie odvozené od rakoviny související s pohlavím (Ravindranath et al., 2006). Epikatechin je možným akceptorem radikálů a má autooxidační účinky polyfenolů (Ghosh et al., 2013). Ve studii podle Bustos et al. (2012) došlo k výrazné inhibici adherence u *Lactobacillus acidophilus* LA-5 a *Lactobacillus plantarum* IFPL379, po aplikaci flavan-3-olů až na epigallokatechin gallát, který zvyšoval adhezi k buněčné kultuře Caco-2 u *L. acidophilus* LA-5.



Obr. 2 Epikatechin gallát (<http://www.chemfaces.com/natural/Epicatechin-gallate-CFN99570.html>)

### 3.2.1.2 Floretin

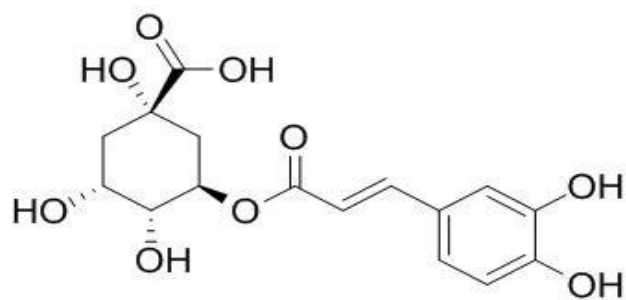
Floretin (Obr. 3) je flavonoid, který patří do skupiny dihydrochalkonů. Nachází se v hruškách a jablkách (Park et al., 2007), kde je přítomen v glykosidické formě, která se nazývá floridzin (Crespy et al., 2001). Může inhibovat grampozitivní bakterie a může působit antimikrobiálně, a to i proti gramnegativní bakterii *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 (Barreca et al., 2014). Floretin inhibuje růst HT-29 buněk indukci apoptózy (Park et al., 2007). Antioxidant floretin působí také jako inhibitor tvorby biofilmu *Escherichia coli* O157:H7 a jako protizánětlivý prostředek při zánětlivých onemocněních tlustého střeva (Lee et al., 2011).



Obr. 3 Floretin (<http://www.chemfaces.com/natural/Phloretin-CFN97040.html>)

### 3.2.1.3 Chlorogenová kyselina

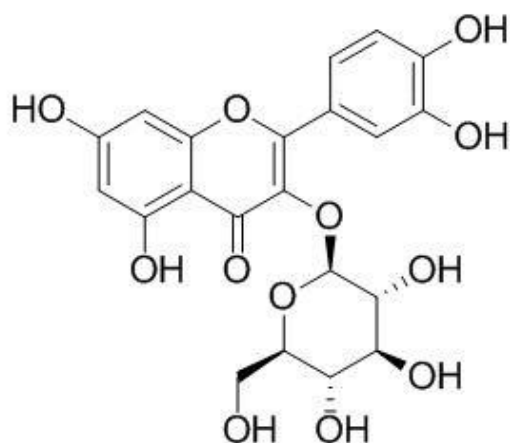
Chlorogenová kyselina (Obr. 4) je fenolová kyselina, přesněji derivát skořicové kyseliny. Jde o ester kávové kyseliny a chinové kyseliny. Nachází se nejvíce v lilku, kde tvoří 70 % až 90 % z celkového obsahu polyfenolů (Gramazio et al., 2014). Je jedním z nejrozšířenějších polyfenolů v ovoci, především v jablkách, švestkách a třešních. Bylo prokázáno, že chlorogenová kyselina má anxiolytické účinky, spojené s antioxidační aktivitou *in vivo* a že chrání granulocyty před oxidačním stresem *in vitro* (Bouayed et al., 2007). Chlorogenová kyselina je přítomná i v kávě, pravděpodobně chrání neurony před glutamátovou neurotoxicitou regulováním vstupu  $\text{Ca}^{2+}$  do neuronů, což může mít klinický přínos pro neurodegenerativní onemocnění, jako je ischemická cévní mozková příhoda (Mikami and Yamazawa, 2015).



Obr. 4 Chlorogenová kyselina (<http://www.chemfaces.com/natural/Chlorogenic-acid-CFN99116.html>)

#### 3.2.1.4 Isokvercitrin

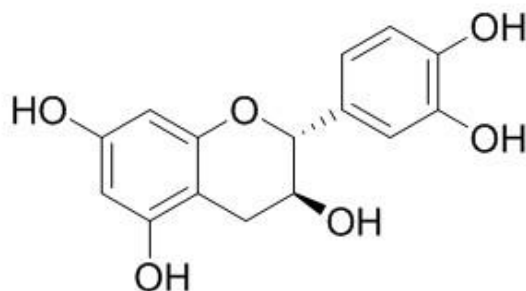
Isokvercitrin (Obr. 5) (kvercetin 3-O-glukosid) se běžně vyskytuje v léčivých bylinách, ovoci, zelenině, nápojích a potravinách rostlinného původu. Isokvercitrin má vyšší biologickou dostupnost než kvercetin. Vykazuje řadu chemoprotektivních účinků jak *in vitro*, tak *in vivo* (Valentová et al., 2014). Hlavními možnými metabolity isokvercitrinu jsou kvercetin, acetylovaný isokvercitrin, dehydroxylovaný isokvercitrin, hydroxylovaný kvercetin a hydroxymethylovaný kvercetin. Bylo zjištěno, že různé bakterie hrají různé role v metabolismu isokvercitrinu (Lu et al., 2013).



Obr. 5 Isokvercitrin (<http://www.chemfaces.com/natural/Isoquercitrin-CFN98753.html>)

### 3.2.1.5 Katechin

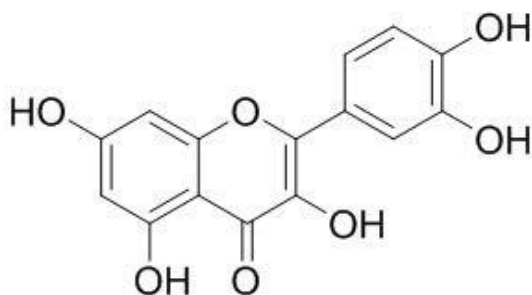
Katechin (Obr. 6) je flavonoid, který patří do skupiny flavan-3-olů. Katechiny jsou hlavními složkami čaje, ale jsou přítomny v mnoha jiných potravinách rostlinného původu. Představují potencionální ochranu proti chronickým onemocněním jako je rakovina a kardiovaskulární onemocnění. (Arts et al., 2001). Léčba katechinem významně zlepšila funkci srdečního svalu u potkanů s chronickým srdečním selháním tím, že katechin může regulovat rovnováhu mezi Th17 a Treg buňkami (Zhang et al., 2014).



Obr. 6 Katechin (<http://www.chemfaces.com/natural/Isoquercitrin-CFN98753.html>)

### 3.2.1.6 Kvercetin

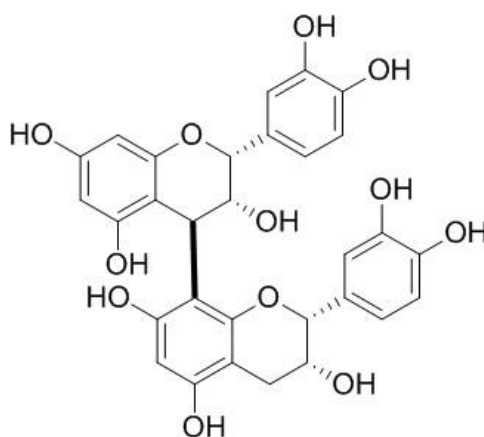
Kvercetin (Obr. 7) je flavonoid, který patří do skupiny flavonolů. Nachází se v ovoci, zelenině, čaji i víně (Boots et al., 2008). Hlavní dietní flavonol působí zároveň jako antioxidant a prooxidant (Salem Alrawaiq and Abdullah, 2014). Má ochranné účinky proti rakovině (Zhang et al., 2015). Kvercetin může být degradován *in vitro* střevními bakteriemi *Clostridium perfringens* a *Bacteroides fragilis* na stejný metabolit, 3,4-dihydroxyfenyloctovou kyselinu. Fermentací kvercetinu vybranými střevními bakteriemi dochází k poklesu jeho antioxidačních účinků (Peng et al., 2014).



Obr. 7 Kvercetin (<http://www.chemfaces.com/natural/Quercetin-CFN99272.html>)

### 3.2.1.7 Prokyanidin B2

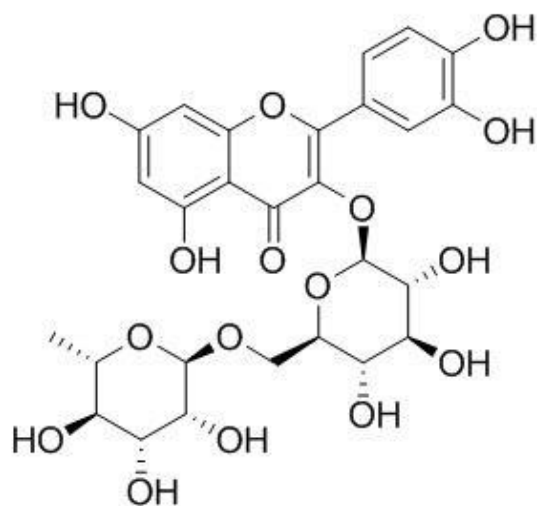
Prokyanidin B2 (Obr. 8) ((-)-epikatechin-(4 $\beta$ →8)-(-)-epikatechin) je flavonoid patřící do skupiny proanthokyanidinů. Je přítomen v jablkách, hroznových jádrech a kakaových bobech. Ve studii účinků na kovem způsobeném poškození DNA vykazoval prokyanidin B2 jak antioxidační, tak prooxidačními vlastnosti interakcí s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a kovovými ionty (Sakano et al., 2005). Prokyanidiny B1 a B2 výrazně zvýšily adhezi u *Lactobacillus casei* LC115 k buňkám HT-29, zatímco epigallokatechin zvýšil adhezi ke Caco-2 u *L. casei* LC115 (Bustos et al., 2012).



Obr. 8 Prokyanidin B2 (<http://www.chemfaces.com/natural/Procyanidin-B2-CFN99558.html>)

### 3.2.1.8 Rutin

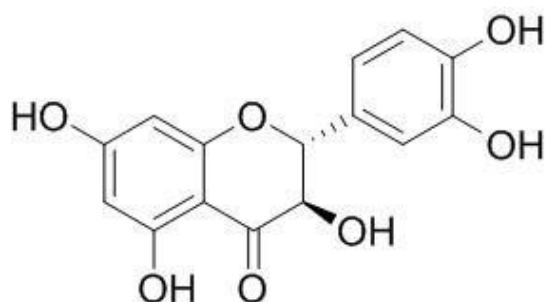
Rutin (Obr. 9) je glykosid, fenolická sloučenina. Aglykon se nazývá kvercetin a cukernatá část rutinosa. Nachází se v různých rostlinných druzích. Mezi jeho biologické aktivity patří zejména schopnost inhibovat agregaci krevních destiček, což způsobuje ředění krve a zlepšuje krevní oběh v oběhové soustavě (Dawidowicz et al., 2015). Používá se jako lék a složka četných multivitaminových a bylinných přípravků (Dawidowicz et al., 2016). Byly prokázány příznivé účinky rutinu, které mají být spojeny s antioxidačními a protizánětlivými účinky a také ochranný vliv na játra (Pan et al., 2014).



Obr. 9 Rutin (<http://www.chemfaces.com/natural/Rutin-CFN99642.html>)

### 3.2.1.9 Taxifolin

Taxifolin (Obr. 10) (5,7,3',4'-flavanonol) je flavonoid patřící do skupiny flavanonolů. Vyvolává kardioprotektivní účinky proti diabetické kardiomyopatii tím, že inhibuje oxidační stres a srdeční apoptózu myocytů. Má tedy potenciál uplatnit se v léčbě tohoto onemocnění (Sun et al., 2014). Taxifolin prokazatelně vykazuje protizánětlivé účinky, jeho glykosid může působit inhibičně proti imunitní odpovědi zprostředkované dendritickými buňkami (Yun et al., 2008).



Obr. 10 Taxifolin (<http://www.chemfaces.com/natural/Taxifolin-CFN98734.html>)

### 3.3 Interakce mikroorganismů s jablečnými polyfenoly

Mezi polyfenoly a střevní mikrobiotou probíhá obousměrná vzájemná interakce s účinky na biologickou dostupnost polyfenolů a na lidské zdraví. Střevní mikrobiota transformuje polyfenoly na jejich metabolity, které mohou mít rozdílnou biologickou dostupnost ve srovnání s původní sloučeninou. Polyfenoly naopak moduluji složení střevní mikrobioty. Fenolické sloučeniny mohou přispívat k rovnováze střevní mikrobioty, mohou působit prebioticky a podílet se tak na zdraví gastrointestinálního traktu. Tato mutuální pak přispívá k pozitivním výsledkům v oblasti lidského zdraví (Ozidal et al., 2016). Například flavonoidy, které nelze vstřebat v tenkém střevě a vstřebané flavonoidy vylučované žlučí, jsou degradovány pomocí mikroorganismů v tlustém střevě (Hollman, 2004).

Eberhardt et al. (2000) připisují inhibiční působení na růst buněk fytochemikáliím obsaženým v jablkách. Ve své studii se zaměřili na ošetření nádorových Caco-2 buněk jablečnými extrakty. Růst buněk byl inhibován v závislosti na dávce přidaného jablečného extraktu a inhibice dosahovala maxima po přidání extraktu v dávce 50 mg/ml.

Jablečné slupky obsahují větší množství polyfenolů než jablečná dužina. Červeně zabarvená dužina některých odrůd jablek může také obsahovat značné množství polyfenolů (Giomaro et al., 2014). Obsah polyfenolů v jablkách se může lišit v závislosti na odrůdě. Bylo zjištěno, že během skladování v chladu byl obsah polyfenolů relativně stabilní (Matthes and Schmitz-Eiberger, 2009). *In vivo* studie, která byla provedena na krysách, dokazuje, že se polyfenoly nachází více v jablečné slupce než v dužině. Vyšší inhibice peroxidace lipidů a vyšší plasmová antioxidační kapacita byla pozorována u krys krmených jablečnými slupkami v porovnání s krysami, které byly krmeny pouze jablečnou dužinou (Leontowicz et al., 2003). Ve studii dle Licht et al. (2010) se autoři naopak domnívají, že účinky na střevní mikrobiotu související s konzumací jablek vykazuje pouze jablečný pektin. Kombinace jablečného koncentrátu bohatého na polyfenoly spolu s pektinem byla také podávána krysám ve studii Aprikian et al. (2003). Bylo zjištěno lepší působení na cekální fermentaci a lipidový metabolismus krys než v případě podání těchto složek zvlášť.

Parkar et al. (2008) zkoumali účinek polyfenolů na růst lidských střevních bakterií a jejich přilnavost k enterocytům. Byl stanoven vliv na růst probiotických (*Lactobacillus rhamnosus*), komenzálních (*Escherichia coli*) a dvou patogenních bakterií (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*) spolu s účinky na adhezi patogenních a probiotických bakterií na kultivovaných buňkách Caco-2. Bylo zjištěno, že vliv na životaschopnost reprezentativní střevní mikrobioty *in vitro*, v dávkách, které mohou být přítomny



v gastrointestinálním traktu, měly všechny polyfenoly, s výjimkou rutinu, ale v rozdílné míře. Naringenin a kvercetin byly nejméně aktivní s nejnižší minimální inhibiční koncentrací pro všechny čtyři testované bakterie. Zbývající polyfenoly měly nejvíce výrazný vliv na gram pozitivní enteropatogen *S. aureus*. Naringenin a floridzin byly nejvíce efektivními inhibitory adherence *S. typhimurium* na Caco-2 enterocyty, zatímco floridzin a rutin způsobovali lepší přilnavost probiotika *L. rhamnosus*.

Ve studii Bustos et al. (2012) byl prokázán vliv flavan-3-olů přijatých z potravy na adhezenci vybraných potenciálně probiotických kmenů laktobacilů k intestinálním buňkám. Byl potvrzen potenciál flavan-3-olů měnit střevní mikroekologii úpravou adherence kmenů laktobacilů na střevní buňky, především díky inhibiční aktivitě těchto sloučenin. Cytotoxický účinek podle nich závisí na chemické struktuře a stupni diferenciaci střevních buněk. Účinek flavan-3-olů na bakteriální adhezi se v této studii značně lišil mezi sloučeninami, kmeny a střevními buňkami.

Vzájemnou interakci mikroorganismů s polyfenoly potvrzuje studie Lee et al. (2006), která zkoumala vliv fenolických složek extraktu čaje a jejich aromatických metabolitů na růst bakterií. Aromatické metabolity vznikaly v závislosti na bakteriálních druzích, bakteriální kmeny se lišily růstovou citlivostí vůči fenolům a jejich derivátům. Růst některých patogenních bakterií, jako je *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile* a *Bacteroides spp.* byl významně potlačen, zatímco komensální anaeroby jako *Clostridium spp.*, *Bifidobacterium spp.* a probiotika, jako *Lactobacillus sp.* byly méně zasaženy. Tato studie ukazuje, že čajové fenoly a jejich aromatické bakteriální metabolity mohou významně ovlivnit střevní prostředí modulací bakteriální populace, pravděpodobně působením jako prebiotika.

Ve studii Duda-Chodak (2012) byl hodnocen vliv polyfenolů na růst několika bakteriálních zástupců lidské intestinální mikrobioty. Zatímco většina testovaných polyfenolů nebyla účinná, jejich aglykony inhibovaly růst téměř všech testovaných bakterií. Pro zvýšení biologické dostupnosti polyfenolů je totiž nezbytné působení střevní mikrobioty. Polyfenoly se nachází v rostlinách především ve formě glykosidů. Většina z nich musí být před absorpcí metabolizována na aglykony. Aglykony vzniklé bakteriálním metabolismem mohou inhibovat růst a aktivitu bakterií přítomných ve střevě. Je možné, že aglykony mohou inhibovat růst některých střevních bakterií. Tímto způsobem mohou aglykony nepřímo interferovat s biologickou dostupností polyfenolických sloučenin.

Antioxidační aktivita fenolových sloučenin obsažených v jablečných extraktech pravděpodobně zabraňuje exogennímu poškození lidských žaludečních epitelových buněk *in vitro* a žaludeční sliznice potkanů *in vivo*. Konzumace jablek tak může příznivě působit

v prevenci žaludečních onemocnění souvisejících s tvorbou reaktivních kyslíkových radikálů (Graziani et al., 2005).

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Materiál

Bakteriální kmeny *Lactobacillus gasseri* R, *Lactobacillus casei* FMP, buněčné kultury Caco-2 (kolorektální adenokarcinom) a HT29-MTX (mucin produkující buněčná linie), fluorescein isothiokyanát (FITC), biochemický test API 50CHL, Dulbecco's fosfátový pufr (DPBS), Dulbecco's Modified Eagle's médium (DMEM), MALDI BioTyper (TM), Rogosa agar, Man, Rogosa a Sharpe (MRS) živná půda, polyfenoly (katechin, epikatechin, chlorogenová kyselina, floretin, prokyanidin B2, kvercetin, isokvercitrin, rutin a taxifolin), neesenciální aminokyseliny, fetální bovinní sérum (FBS), penicilin, streptomycin, Triton-X100, fosfátový pufr (PBS), methanol (80%), dimetylsulfoxid (DMSO). Všechny chemické roztoky a látky byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (CZ).

### 4.2 Metody

#### 4.2.1 Bakteriální kmeny a podmínky kultivace

Bakteriální kmen *Lactobacillus gasseri* R byl izolován ze vzorku stolice plně kojeného jednoměsíčního kojence a bakteriální kmen *Lactobacillus casei* FMP byl izolován z komerčního fermentovaného mléčného produktu pomocí Rogosa agaru (Oxoid, UK) po 72 hodinách mikroaerofilní kultivace při teplotě 37 °C. Vybrané kmeny byly identifikovány na základě Gramova barvení a fluorescenční *in situ* hybridizace za použití fluorescein isothiokyanátové (FITC) značené sondy specifické pro rod *Lactobacillus* (BioVisible, NL). Laktobacily byly dále identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie za použití přístroje MALDI BioTyper (TM) (Bruker Daltonik, DE) podle metodiky Kmet' and Drugdová (2012) a charakterizovány biochemickým testem API 50CHL (bioMerieux, FR). Oba kmeny laktobacilů byly kultivovány 24 hodin na Man, Rogosa a Sharpe (MRS) živné půdě (Oxoid) při teplotě 37 °C za anaerobních podmínek. Nakultivované kmeny laktobacilů byly zcentrifugovány (2000 × g; 10 min) a dvakrát promyty v Dulbecco's fosfátovém pufru. Bakteriální suspenze byly následně resuspendovány v Dulbecco's Modified Eagles's médiu bez přídavku antibiotik na konečnou koncentraci  $2 \times 10^8$  KTJ/ml na základě měření optické hustoty při 420 nm (Infinite M200; Tecan, AT).

#### 4.2.2 IC<sub>50</sub> test inhibiční koncentrace

Před vlastním testem adherence byly vybrány vhodné koncentrace vybraných polyfenolů na základě testování cytotoxicity. Životaschopnost buněk byla měřena za použití MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyyl tetrazolium bromid) testu. Caco-2, HT29-MTX a ko-kultura Caco-2/HT29-MTX byly předem inkubovány v 96jamkové destičce o koncentraci  $3,6 \times 10^3$  Caco-2 buněk a  $0,4 \times 10^3$  HT29-MTX buněk na destičku po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C v 5% CO<sub>2</sub> atmosféře. Buňky byly následně ošetřeny dvojnásobným sériovým ředěním vybraných polyfenolů v rozmezí koncentrací 5-500 µg/ml po dobu 72 hodin. Následně bylo přidáno MTT činidlo (1 mg/ml) v DMEM do každé jamky a destičky byly inkubovány po dobu dalších 2 hodin při teplotě 37 °C. Supernatanty byly odsáty a do každé jamky bylo přidáno 100 µl DMSO. Absorbance byla měřena při 555 nm za použití spektrofotometrického přístroje Tecan Infinite M200 (Tecan Austria, AT). Procento mortality pro každou koncentraci extraktu bylo zaznamenáno a použito ke stanovení 50% inhibiční koncentrace (IC<sub>50</sub>).

#### 4.2.3 Příprava jablečných extraktů a polyfenolů

Pro přípravu jablečných extraktů byla vybrána jablka odrůdy Jonagold (1. jakost) sladce nakyslé chuti (původ ČR). Jablka byla zbavena slupek, nakrájena a odjádřena. Slupky a dužina byly samostatně uchovány pro pozdější extrakci při teplotě -18 °C. V dalším kroku byly oba vzorky lyofilizovány a následně rozmělněny v elektrickém analytickém mlýnku IKA Yellow Line A10 (IKA-Werke, DE) na jemný prášek. Poté byla provedena macerace 80% methanolem. Vzniklé maceráty byly přelity do odpařovacích baněk a odpařeny na vakuové odparce Laborota 4000 (Heidolph Instruments, DE) při 40 °C. Vzorky byly dále rozpuštěny v DMSO (extrakt z jablečných slupek v koncentraci 200 mg/ml a extrakt z jablečné dužiny v koncentraci 50 mg/ml), přefiltrovány přes injekční stříkačku s filtrem 0,45 µm a uskladněny při teplotě -18 °C pro další testování. Zásobní roztoky jablečných extraktů v DMSO byly naředěny pomocí PBS na konečnou koncentraci 20 µg/ml.

Polyfenoly katechin, epikatechin, chlorogenová kyselina, floretin, prokyanidin B2, kvercetin, isokvercitrin, rutin a taxifolin byly zakoupeny od firmy Extrasynthese (Genay Cedex, FR). Roztoky jednotlivých polyfenolů byly připraveny zředěním v PBS na konečné koncentrace v rozmezí 2,5-45 µg/ml.

#### 4.2.4 Buněčné kultury

Lidské buněčné kultury tlustého střeva Caco-2 (kolorektální adenokarcinom) a HT29-MTX (mucin produkující buněčná linie) byly získány ze sbírky American Type Tissue Collection (Rockville, USA). Obě buněčné linie byly kultivovány v Dulbecco's Modified Eagle's médiu (DMEM) doplněném o 10% fetální bovinní sérum (FBS), 1 % neesenciálních aminokyselin, 100 U/ml penicilinu a 100 µg/ml streptomycinu. Kultury byly inkubovány při teplotě 37 °C v 5% CO<sub>2</sub> atmosféře. Médium bylo měněno každé dva dny a buňky byly subkultivovány do dosažení 80% konfluency každý týden.

#### 4.2.5 Stanovení adherence

Test adherence byl proveden podle metodiky Volštátová et al. (2015, 2016). Buněčné linie byly naočkovány do 24jamkových kultivačních destiček v koncentraci  $3,6 \times 10^4$  Caco-2 buněk na jamku a  $0,4 \times 10^4$  HT29-MTX buněk na jamku. Po zaočkování byly buňky kultivovány 14 dní při teplotě 37 °C v 5% CO<sub>2</sub> atmosféře o 95% vlhkosti vzduchu až do dosažení plné diference mikrokulturních. Kultivační médium bylo měněno každé dva dny.

Před vlastním testem byly vrstvy buněk třikrát promyty pomocí DPBS za účelem odstranění antibiotik. Do předem promytých buněčných monovrstev byly přidány bakteriální suspenze (1 ml na jamku). Poté bylo přidáno 100 µl zředěných jablečných extraktů nebo vybrané polyfenoly. Do kontrolních jamek bylo přidáno 100 µl PBS. Destičky byly inkubovány po dobu 1 hodiny při teplotě 37 °C v 5% CO<sub>2</sub> atmosféře. Po dokončení inkubace byly vrstvy buněk opět třikrát opatrně promyty pomocí DPBS, aby došlo k odstranění nepřichycených bakterií. Následně byly buňky trypsinizovány přidáním 300 µl 1% Triton-X100 na jamku po dobu 3 minut s následným přidáním 700 µl PBS. Suspenze s životaschopnými přichycenými bakteriemi byly přeneseny do mikrozkušavek a naředěny a zaočkovány na MRS agar na Petriho miskách. Počty narostlých kolonií byly stanoveny po 48 hodinové inkubaci při teplotě 37 °C v aerobní atmosféře a vyjádřeny jako procenta přichycených bakterií ve srovnání s celkovým množstvím přidávaných bakterií. Všechny testy pro každý kmen byly provedeny ve třech nezávislých opakováních.

#### 4.2.6 Statistická analýza

Statistická analýza byla provedena pomocí statistického softwaru GraphPad Prism verze 6.0 (GraphPad Software, USA). Testy pro stanovení bakteriální adherence byly analyzovány za použití jednofaktorové analýzy rozptylu (ANOVA) s post-hoc testem (Bonferroni).

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka. Statisticky významné hodnoty jsou považovány při hladině významnosti  $P < 0,05$ .

## 5 Výsledky

V tabulce 1 byla zobrazena data naměřených hodnot  $IC_{50}$ , vyjádřených jako průměry  $\pm$  směrodatné odchylky ze tří nezávislých stanovení. Na základě otestované cytotoxicity byly pro vlastní testy adherence zvoleny vhodné koncentrace vybraných polyfenolů.

Tab. 1  $IC_{50}$  hodnoty testovaných polyfenolových látek

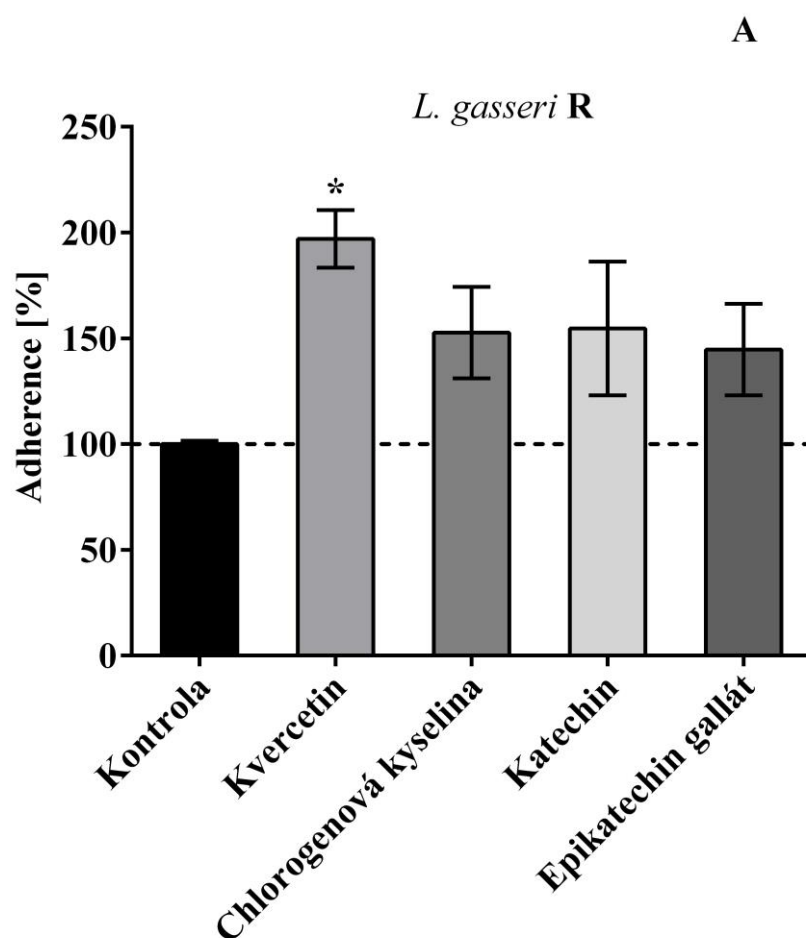
	<b>Caco-2</b>	<b>HT29-MTX</b>	<b>Caco-2/HT29-MTX</b>
Epikatechin gallát	65,1 $\pm$ 9,7	83,5 $\pm$ 14,4	90,4 $\pm$ 5,1
Floretin	40,8 $\pm$ 23,1	21,9 $\pm$ 0,4	25,7 $\pm$ 8,2
Chlorogenová kyselina	73,9 $\pm$ 7,9	207,1 $\pm$ 12,6	119,6 $\pm$ 20,7
Isokvercitrin	> 500	> 500	> 500
Katechin	417,3 $\pm$ 17,8	227,6 $\pm$ 60,4	416,8 $\pm$ 20,0
Kvercetin	33,1 $\pm$ 3,8	83,9 $\pm$ 30,4	50,7 $\pm$ 2,3
Prokyanidin B2	> 500	229,9 $\pm$ 16,2	329,0 $\pm$ 64,9
Rutin	> 500	> 500	> 500
Taxifolin	27,5 $\pm$ 6,3	78,3 $\pm$ 1,8	44,9 $\pm$ 8,4

Následně byl otestován vliv jablečných extraktů (slupka, dužina) na adhezenční vlastnosti dvou bakteriálních kmenů *Lactobacillus gasseri* R a *Lactobacillus casei* FMP. U obou použitých bakteriálních kmenů došlo po přidavku extraktu z jablečné slupky ke zvýšení adhezenčních schopností, zatímco v případě extraktu z jablečné dužiny byl efekt u obou laktobacilů s adhezenčními schopnostmi opačný (Tab. 2).

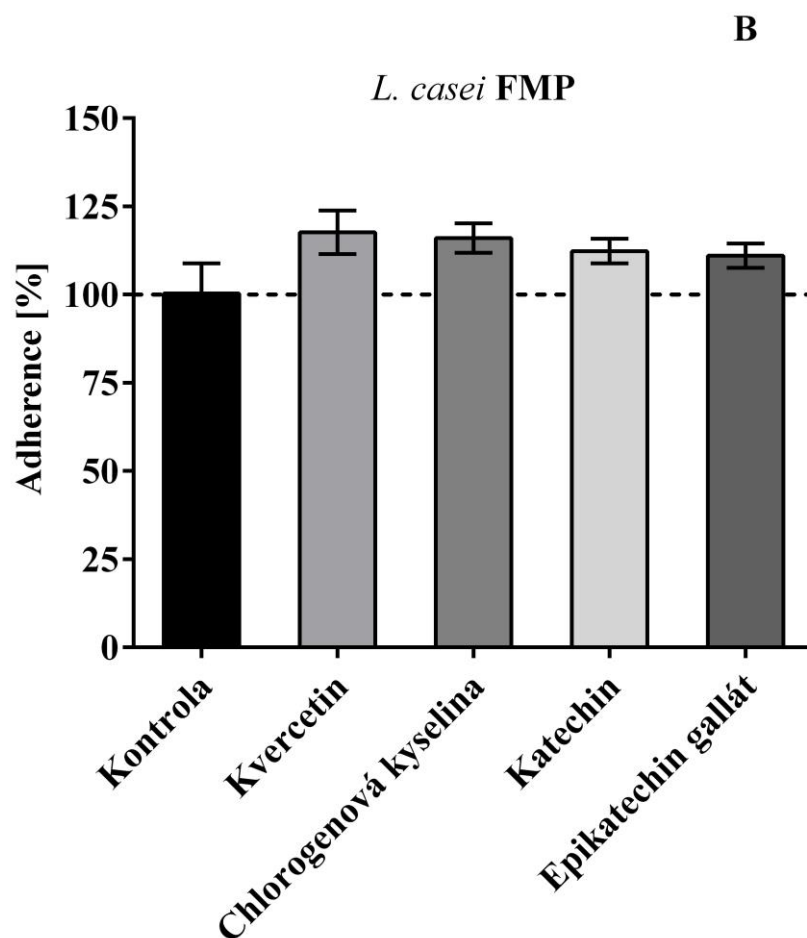
Tab. 2 Vliv jablečných extraktů v koncentraci 20  $\mu$ g/ml na schopnost adherence kmene *Lactobacillus casei* FMP a kmene *Lactobacillus gasseri* R.

	<b><i>L. casei</i></b>	<b><i>L. gasseri</i></b>
Jablečná slupka	4,8 $\pm$ 0,1	6,4 $\pm$ 0,8
Jablečná dužina	3,9 $\pm$ 0,1	2,4 $\pm$ 0,5
<b>Kontrola</b>	<b>4,2 <math>\pm</math> 0,5</b>	<b>5,7 <math>\pm</math> 0,1</b>

V návaznosti na experiment s jablečnými extrakty byl otestován vliv nejčteněji zastoupených čtyř polyfenolů v jablkách (kvercetin, chlorogenová kyselina, katechin, epikatechin gallát) v koncentraci 20 µg/ml. K nejvýraznějšímu zvýšení adherence v porovnání s kontrolou došlo v případě přidání polyfenolu kvercetinu u kmene *L. gasseri* R, a to o více než 95 %. U kmene *L. casei* FMP nebylo zvýšení po přidání kvercetinu tak značné. Ostatní vybrané polyfenoly ovlivnily adherenci do jisté míry u obou bakteriálních kmenů (Graf 1A, 1B).







Graf 1 Adherence kmenů *Lactobacillus gasseri* R (A) a *Lactobacillus casei* FMP (B) ( $2 \times 10^8$  KTJ/ml) ke ko-kultuře buněčných linií Caco-2 a HT-29 MTX po ošetření polyfenolovými látkami v koncentraci 20  $\mu\text{g/ml}$ . Hodnoty jsou vyjádřeny jako procento bakteriální adherence po 1 hodině působení polyfenolových látek. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka. \* statisticky významné hodnoty na hladině významnosti  $P < 0,05$  ve srovnání s kontrolou.

V důsledku objasnění spojitosti mezi polyfenoly a střevními bakteriemi ve větší míře byl proveden následný experiment vlivu devíti jablečných polyfenolů na adherenci probiotických bakteriálních kmenů *Lactobacillus gasseri* R (Tab. 3) a *Lactobacillus casei* FMP (Tab. 4) k buňkám střevní mukózy *in vitro*. U obou kmenů laktobacilů byl prokázán vliv všech vybraných polyfenolů v koncentracích 2,5–45  $\mu\text{g/ml}$  na schopnost adherence. Statisticky významné ( $P < 0,05$ ) zvýšení adherence kmene *Lactobacillus gasseri* R bylo zaznamenáno při použití polyfenolů kvercetinu v koncentraci 5  $\mu\text{g/ml}$ , floretinu v koncentraci 10,0  $\mu\text{g/ml}$  a isokvercitrinu v koncentraci 22,5  $\mu\text{g/ml}$ .

Tab. 3 Vliv různých polyfenolů na schopnost adherence bakteriálního kmene *Lactobacillus gasseri* R. <sup>a</sup>

	Koncentrace polyfenolů [μg/ml]				
	2,5	5,0	10,0	22,5	45,0
Epikatechin gallát	20,6 ± 1,5	19,8 ± 7,7	19,9 ± 4,9	19,7 ± 0,3	19,4 ± 4,8
Floretin	20,3 ± 2,8	19,5 ± 7,6	26,0 ± 2,8*	22,7 ± 7,6	25,2 ± 4,1
Chlorogenová kys.	19,1 ± 8,5	18,5 ± 0,9	23,4 ± 4,9	19,6 ± 0,3	22,2 ± 1,6
Isokvercitrin	22,1 ± 5,2	21,4 ± 1,9	23,5 ± 7,4	25,8 ± 1,4*	23,6 ± 2,5
Katechin	19,1 ± 4,7	19,5 ± 9,1	18,5 ± 0,3	18,0 ± 3,9	17,8 ± 0,5
Kvercetin	20,7 ± 4,7	25,6 ± 1,6*	20,7 ± 2,3	21,5 ± 0,1	18,0 ± 2,2
Prokyanidin B2	24,4 ± 2,9	21,4 ± 6,9	22,3 ± 1,4	23,2 ± 10,1	18,7 ± 3,7
Rutin	24,9 ± 6,3	23,6 ± 0,6	19,2 ± 0,1	22,5 ± 0,3	18,9 ± 4,7
Taxifolin	18,1 ± 1,9	22,1 ± 0,3	22,2 ± 6,7	21,6 ± 10,4	18,1 ± 5,7
<b>Kontrola</b>	<b>17,9 ± 6,8</b>				

\* Významný rozdíl ( $P < 0,05$ ) ve srovnání s kontrolou.

<sup>a</sup> Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr procenta životaschopnosti buněk vzhledem ke kontrolním buňkám ± směrodatná odchylka.

Polyfenoly kvercetin, floretin a isokvercitrin také zvyšovaly schopnost adherence kmene *Lactobacillus casei* FMP. V mnoha případech šlo o výrazné zvýšení ( $P < 0,05$ ) adherence. Nejvýznamněji ovlivnil adherenci kvercetin, ke zvýšení došlo ve všech použitých koncentracích v závislosti na dávce. Druhým nejúčinnějším polyfenolem byl rutin v koncentracích 5; 10; 22,5 a 45 μg/ml. Isokvercitrin způsobil mírné, ale významné zvýšení přilnavosti bakterií v koncentracích 2,5; 10 a 22,5 μg/ml. Taxifolin vykazoval významné zvýšení adherence v koncentraci 10 μg/ml. Adherenci také významně zvýšili epikatechin gallát, chlorogenová kyselina a floretin při nejvyšší použité koncentraci 45 μg/ml. Celkově lepší schopnost adherovat k *in vitro* modelu střevní mukózy vykazoval kmen *Lactobacillus gasseri* R v porovnání s kmenem *Lactobacillus casei* FMP.

Tab. 4 Vliv různých polyfenolů na schopnost adherence bakteriálního kmene *Lactobacillus casei* FMP.<sup>a</sup>

	Koncentrace polyfenolů [μg/ml]				
	2,5	5,0	10,0	22,5	45,0
Epikatechin gallát	3,7 ± 0,2	3,4 ± 0,1	3,8 ± 0,4	4,9 ± 1,5	7,6 ± 0,3*
Floretin	4,3 ± 0,3	2,3 ± 0,0	4,0 ± 0,4	5,8 ± 0,3	4,4 ± 0,3*
Chlorogenová kyselina	4,4 ± 1,0	4,6 ± 1,0	3,8 ± 1,8	5,0 ± 1,2	4,6 ± 0,4*
Isokvercitrin	5,5 ± 1,0*	6,4 ± 1,2	5,0 ± 0,3*	5,1 ± 0,4*	4,9 ± 0,4
Katechin	3,5 ± 0,2	3,2 ± 0,4	2,7 ± 0,0	3,7 ± 1,2	3,9 ± 0,7
Kvercetin	5,3 ± 0,4*	5,4 ± 0,6*	5,0 ± 0,0*	5,4 ± 0,3*	5,6 ± 0,9*
Prokyanidin B2	3,5 ± 0,6	4,0 ± 0,2	3,8 ± 0,4	2,7 ± 0,3	3,3 ± 0,6
Rutin	6,3 ± 0,7	6,0 ± 0,6*	5,5 ± 0,2*	5,7 ± 0,2*	5,8 ± 0,3*
Taxifolin	3,4 ± 1,0	6,4 ± 3,0*	4,9 ± 0,2*	3,6 ± 0,7	2,6 ± 0,2
<b>Kontrola</b>	<b>3,1 ± 0,2</b>				

\* Významný rozdíl ( $P < 0,05$ ) ve srovnání s kontrolou.

<sup>a</sup> Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr procenta životaschopnosti buněk vzhledem ke kontrolním buňkám ± směrodatná odchylka.

## 6 Diskuse

Pro zjištění, zda jablečné polyfenoly ovlivňují adhezní schopnosti probiotických kmenů laktobacilů v *in vitro* modelu trávicího traktu, byla testována schopnost adherence bakteriálních kmenů *Lactobacillus gasseri* R a *Lactobacillus casei* FMP k buněčným liniím Caco-2 kolorektálnímu adenokarcinomu, který reprezentuje enterocyty; k HT29-MTX mucin produkující buněčné linii představující pohárkové buňky a k jejich ko-kultuře Caco-2/HT29-MTX, která nejlépe odpovídá přirozeným *in vivo* podmínkám v gastrointestinálním traktu (Pontier et al., 2001). Přestože *in vitro* modely mikrobiální adherence mají o něco nižší výpovědní hodnotu než *in vivo* modely, jsou důležité pro pochopení mechanismů adherence před samotným testováním hypotéz *in vivo* a jsou v tomto směru cenným přínosem (Fritz et al., 2013).

Byla hodnocena cytotoxicita vybraných jablečných polyfenolů za použití MTT testu. Všechny testované polyfenoly inhibovaly životaschopnost všech střevních buněčných linií v závislosti na dávce. Na základě otestované cytotoxicity byly pro vlastní testy adherence zvoleny vhodné koncentrace vybraných polyfenolů. Koncentrace čtyř nejčteněji zastoupených polyfenolů v jablkách s ohledem na předběžné testování jablečných extraktů (dužiny, slupky) nepřesáhla 20 µg/ml. Ve studii dle Eberhardt et al. (2000) byla přisouzena inhibice růstu nádorových buněk právě fytochemikáliím, které se nacházejí v jablkách. Růst Caco-2 buněk po přidání jablečných extraktů byl také inhibován v závislosti na dávce extraktu. Inhibice dosahovala maxima v dávce 50 mg/ml. Parkar et al. (2008) ve své studii zjistili, že vliv na životaschopnost střevní mikrobioty *in vitro*, měly s výjimkou rutinu všechny testované polyfenoly, ale v rozdílné míře. Naringenin a kvercetin byly nejaktivnější s nejnižší minimální inhibiční koncentrací pro všechny čtyři testované bakterie. Podle studie Bustos et al. (2012) závisí cytotoxický účinek na chemické struktuře a stupni diferenciaci střevních buněk.

Následně byla stanovena schopnost adherence dvou bakteriálních kmenů *Lactobacillus gasseri* R a *Lactobacillus casei* FMP po přidání jablečných extraktů ze slupky a z dužiny. V porovnání obou kmenů vykazoval nižší schopnost adherence na střevní model kmen *L. casei* FMP než kmen *L. gasseri* R. V souladu se získanými výsledky byla ve studii dle Duary et al. (2011) prokázána lepší hydrofobnost a schopnost přilnout k epitelovým buňkám v podmínkách *in vitro* u kmenů *Lactobacillus*, které byly izolovány z lidských fekálních vzorků, ve srovnání s kmeny izolovanými z fermentovaných mléčných produktů.

Přidáním extraktu z jablečné slupky došlo u obou použitých bakteriálních kmenů ke zvýšení adherence, avšak v případě přidání extraktu z jablečné dužiny byl účinek na adherenci

u obou laktobacilů opačný. Tento efekt se projevil nejspíše proto, že se biologicky aktivní polyfenolové látky vyskytují především ve slupce a jejich přítomnost v dužině je spíše ojedinělá. Leontowicz et al. (2003) svou *in vivo* studií provedenou na krysách potvrzují, že polyfenoly nalezneme spíše ve slupce než v dužině. Také Burda et al. (1990) tvrdí, že koncentrace celkových fenolů je ve slupce jablek mnohem větší než v dužině. Naproti tomu Licht et al. (2010) přisuzují účinky na střevní mikrobiotu spojené s konzumací jablek pouze jablečnému pektinu. Aprikian et al. (2003) dokázali, že jablečný koncentrát bohatý na polyfenoly podávaný krysám spolu s pektinem, vykazoval lepší účinky na cekální fermentaci a lipidový metabolismus krys, než když byly tyto dvě složky předkládány samostatně.

Přibližně 90-95 % polyfenolů není absorbováno v tenkém střevě, a místo toho dorazí do střeva tlustého, kde jsou následně vstřebávány (Manach et al., 2004). V následujícím experimentu byl tedy v souvislosti s testováním vlivu jablečných extraktů zjišťován vliv čtyř nejčtetněji zastoupených polyfenolů v jablkách (kvercetin, chlorogenová kyselina, katechin a epikatechin gallát) v koncentraci 20 µg/ml na adhezenční schopnosti laktobacilů. Nejvýraznější zvýšení adherence v porovnání s kontrolou nastalo v případě přidání polyfenolu kvercetinu u kmene *L. gasseri* R, a to o více než 95 %. U kmene *L. casei* FMP nebylo zvýšení adherence po přidání kvercetinu tak výrazné. Ostatní testované polyfenoly ovlivnily adhezenční schopnosti do jisté míry u obou bakteriálních kmenů. *In vitro* kultivační studie ukazují, že polyfenoly mohou podporovat různé bakteriální skupiny, jako například rutin, kvercetin a chlorogenová kyselina prokazatelně podporují růst bifidobakterií (Parkar et al., 2013). Nicméně, vliv polyfenolů na modulaci střevního mikrobiomu, včetně mechanismů je stále nedostatečně prozkoumán, proto existují hypotézy ohledně selektivní schopnosti bakterií používat polyfenoly ve střevech jako substráty, nebo inhibiční účinky spojené se změnou funkce bakteriální buněčné stěny (Cardona et al., 2013; Kemperman et al., 2010; Tabasco et al., 2011). Získané výsledky značně korelují s předcházejícími hypotézami, a tudíž naznačují, že polyfenoly mohou působit jako faktor podporující adhezenční vlastnosti prospěšných mikroorganismů.

U obou testovaných kmenů laktobacilů byl prokázán vliv na adhezenční schopnosti po přidání devíti polyfenolů v koncentracích 2,5–45 µg/ml. Tento experiment byl proveden za účelem objasnění vztahu mezi polyfenoly a střevními bakteriemi. Statisticky významné ( $P < 0,05$ ) zvýšení adherence kmene *L. gasseri* R bylo zaznamenáno při použití polyfenolů kvercetinu, floretinu a isokvercitrinu. Vzájemnou interakci mikroorganismů s polyfenoly potvrzuje studie dle Lee et al. (2006). Polyfenoly a jejich metabolity mohou významně ovlivnit střevní

prostředí modulací bakteriální populace, pravděpodobně působením jako prebiotika (Hervert-Hernandez and Goni, 2011).

Adherenční schopnost kmene *L. casei* FMP se zvýšila po přidavku kvercetinu, floretinu a isokvercitrinu. Kvercetin zvýšil adherenci ve všech koncentracích. Druhým nejúčinnějším polyfenolem byl rutin, glykosid, jehož aglykonem je kvercetin a cukernatou část tvoří rutinosa. Dle studie Duda-Chodak (2012) nebyla většina testovaných polyfenolů účinná, avšak jejich aglykony inhibovaly růst téměř všech testovaných bakterií. Ve studii (Parkar et al., 2008) zvyšoval rutin a floridzin přilnavost probiotika *Lactobacillus rhamnosus*, zatímco naringenin a floridzin byly nejúčinnějšími inhibitory adherence *Salmonella typhimurium* na Caco-2 enterocyty.

Isokvercitrin, taxifolin, epikatechin gallát, chlorogenová kyselina a floretin významně zvýšili adherenci, ale pouze v určitých koncentracích. Ve studii, kterou provedli Bustos et al. (2012), byl prokázán vliv flavan-3-olů na adherenci laktobacilů k intestinálním buňkám a jejich potenciál měnit tak složení střevní mikrobioty, především díky inhibiční aktivitě těchto sloučenin. Účinek flavan-3-olů se v této studii značně lišil mezi sloučeninami, kmeny a střevními buňkami. Adherenci kmene *Lactobacillus casei* LC115 k buňkám HT-29 výrazně zvýšily prokyanidiny B1 a B2, zatímco epigallokatechin zvýšil adherenci k buňkám Caco-2. Většina flavonoidů, kromě podtřídy katechinů, je přítomna v rostlinách ve formě vázané na cukry jako glykosidy. Tato strukturální funkce určuje, zda může být flavonoid absorbován v tenkém střevě nebo až v tlustém střevě. Až na výjimky jsou glukosidy jediné glykosidy, které mohou být absorbovány z tenkého střeva (Hollman, 2004). Stupeň absorpce flavonoidů se liší se mezi jednotlivými podtřídami. Biologická aktivita u lidí je limitována biologickou dostupností a biotransformací. Nejvyšší biologická dostupnost byla stanovena pro isoflavony, následně pro flavanoly, flavanony a flavonolové glykosidy. Metabolity flavonoidů jsou patrně zodpovědné za zdraví prospěšné účinky (Viskupičová, 2008).

Na základě výsledků této studie bylo prokázáno, že vybrané jablečné polyfenoly zvyšují schopnost adherence potenciálních probiotických kmenů *L. gasseri* R a *L. casei* FMP ke stěně střevního epitelu. Z toho vyplývá, že konzumace jablek s vysokým obsahem polyfenolů může pomoci udržovat mikrobiální rovnováhu intestinálního prostředí a přispívat tak ke zdraví hostitele.

## 7 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo ověřit, zda jablečné polyfenoly ovlivňují adhezní schopnosti probiotických kmenů laktobacilů v *in vitro* modelu trávicího traktu na Caco-2 a HT29-MTX buněčných liniích.

Bylo zjištěno, že přidavek extraktů z jablečné slupky, na rozdíl od extraktů z jablečné dužiny, může zvýšit schopnost adherence bakteriálních probiotických kmenů *Lactobacillus* k epiteliálním střevním buňkám. Tento efekt je připisován jablečným polyfenolům přítomným především ve slupce. V návaznosti na toto zjištění byly testovány čtyři nejčastěji zastoupené polyfenoly v jablkách, které také zvyšovaly adhezní schopnosti bakterií. Pro lepší objasnění spojitosti mezi polyfenoly a střevními bakteriemi byla stanovena adhezní schopnost pro devět jablečných polyfenolů. Většina z nich zvýšila přilnavost obou kmenů laktobacilů k *in vitro* modelu trávicího traktu.

Protože je mikrobiální adhezní schopnost základním předpokladem k osídlení intestinálního traktu, může zvýšení adhezní schopnosti probiotických bakteriálních kmenů ke střevní sliznici vést k příznivé změně složení a udržení rovnováhy střevní mikrobioty. Konzumace jablek bohatých na polyfenoly tedy může příznivě ovlivnit střevní mikrobiotu, která pak svým působením může přispívat ke zdraví hostitele.

## 8 Seznam literatury

- Aprikian, O., Duclos, V., Guyot, S., Besson, C., Manach, C., Bernalier, A., Morand, C., Rémésy, C., Demigné, C. 2003. Apple pectin and a polyphenol-rich apple concentrate are more effective together than separately on cecal fermentations and plasma lipids in rats. *Journal of Nutrition*. 133. 1860-1865.
- Aron, P. M., Kennedy, J. A. 2008. Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. *Molecular Nutrition and Food Research* 52 (1):79-104.
- Arts, I. C. W., Hollman, P. C. H., Feskens, E. J. M., Bueno De Mesquita, H. B., Kromhout, D. 2001. Catechin intake and associated dietary and lifestyle factors in a representative sample of Dutch men and women. *European Journal of Clinical Nutrition* 55 (2):76-81.
- Barreca, D., Bellocco, E., Laganà, G., Ginestra, G., Bisignano, C. 2014. Biochemical and antimicrobial activity of phloretin and its glycosilated derivatives present in apple and kumquat. *Food Chemistry* 160:292-297.
- Barrett, K. E., Barman, S. M., Boitano, S., Brooks, H. 2009. *Ganong's Review of Medical Physiology*, 23rd Edition, Lange Basic Science Series: McGraw-hill. p. 430. ISBN: 9780071605670.
- Bohn, T. 2014. Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. *Nutrition Reviews* 72 (7):429-452.
- Boots, A. W., Haenen, G. R. M. M., Bast, A. 2008. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology* 585 (2-3):325-337.
- Bouayed, J., Rammal, H., Dicko, A., Younos, C., Soulimani, R. 2007. Chlorogenic acid, a polyphenol from *Prunus domestica* (Mirabelle), with coupled anxiolytic and antioxidant effects. *Journal of the Neurological Sciences* 262 (1-2):77-84.
- Burda, S., Oleszek, W., Lee, C. Y. 1990. Phenolic compounds and their changes in apples during maturation and cold storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38 (4):945-948.
- Bustos, I., García-Cayuela, T., Hernández-Ledesma, B., Peláez, C., Requena, T., Martínez-Cuesta, M. C. 2012. Effect of flavan-3-ols on the adhesion of potential probiotic lactobacilli to intestinal cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (36):9082-9088.



- Cardona, F., Andrés-Lacueva, C., Tulipani, S., Tinahones, F. J., Queipo-Ortuño, M. I. 2013. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *Journal of Nutritional Biochemistry* 24 (8):1415-1422.
- Corfield, A. P. 2015. Mucins: A biologically relevant glycan barrier in mucosal protection. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1850 (1):236-252.
- Crespy, V., Aprikian, O., Morand, C., Besson, C., Manach, C., Demigné, C., Rémésy, C. 2001. Bioavailability of phloretin and phloridzin in rats. *Journal of Nutrition* 131 (12):3227-3230.
- Dawidowicz, A. L., Bernacik, K., Typek, R. 2015. Rutin Transformation During Its Analysis Involving Extraction Process for Sample Preparation. *Food Analytical Methods*.
- Dawidowicz, A. L., Bernacik, K., Typek, R. 2016. Does the Plant Matrix Type Have Impact on Rutin Transformation During Its Extraction?. *Food Analytical Methods* 9 (7):2042-2051.
- Duary, R. K., Rajput, Y. S., Batish, V. K., Grover, S. 2011. Assessing the adhesion of putative indigenous probiotic lactobacilli to human colonic epithelial cells. *Indian Journal of Medical Research* 134 (11):664-671.
- Duda-Chodak, A. 2012. The inhibitory effect of polyphenols on human gut microbiota. *Journal of Physiology and Pharmacology* 63 (5):497-503.
- Duda-Chodak, A., Tarko, T., Satora, P., Sroka, P. 2015. Interaction of dietary compounds, especially polyphenols, with the intestinal microbiota: a review. *European Journal of Nutrition* 54 (3):325-341.
- Eberhardt, M. V., Lee, C. Y., Liu, R. H. 2000. Antioxidant activity of fresh apples. *Nature* 405 (6789):903-904.
- FAO/WHO. Working Group. 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. London Ontario, Canada.
- Fritz, J. V., Desai, M. S., Shah, P., Schneider, J. G., Wilmes, P. 2013. From meta-omics to causality: Experimental models for human microbiome research. *Microbiome* 1 (1). doi: 10.1186/2049-2618-1-14.
- Ghosh, S., Pandey, N. K., Dasgupta, S. 2013. (-)-Epicatechin gallate prevents alkali-salt mediated fibrillogenesis of hen egg white lysozyme. *International Journal of Biological Macromolecules* 54:90-98.
- Giomaro, G., Karioti, A., Bilia, A. R., Bucchini, A., Giamperi, L., Ricci, D., Fraternali, D. 2014. Polyphenols profile and antioxidant activity of skin and pulp of a rare apple from Marche region (Italy). *Chemistry Central Journal* 8 (1).

- Goldstein, E. J. C., Tyrrell, K. L., Citron, D. M. 2015. Lactobacillus species: Taxonomic complexity and controversial susceptibilities. *Clinical Infectious Diseases* 60:S98-S107.
- Grajek, W., 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.
- Gramazio, P., Prohens, J., Plazas, M., Andjar, I., Herraiz, F. J., Castillo, E., Knapp, S., Meyer, R. S., Vilanova, S. 2014. Location of chlorogenic acid biosynthesis pathway and polyphenol oxidase genes in a new interspecific anchored linkage map of eggplant. *BMC Plant Biology* 14 (1).
- Graziani, G., D'Argenio, G., Tuccillo, C., Loguercio, C., Ritieni, A., Morisco, F., Del Vecchio Blanco, C., Fogliano, V., Romano, M. 2005. Apple polyphenol extracts prevent damage to human gastric epithelial cells in vitro and to rat gastric mucosa in vivo. *Gut* 54 (2):193-200.
- Gustafsson, J. K., Ermund, A., Johansson, M. E. V., Schütte, A., Hansson, G. C., Sjövall, H. 2012. An ex vivo method for studying mucus formation, properties, and thickness in human colonic biopsies and mouse small and large intestinal explants. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 302 (4):430-438.
- Hervert-Hernandez, D., Goni, I. 2011. Dietary polyphenols and human gut microbiota: a review. *Food Reviews International* 27 (2):154-169.
- Hollman, P. C. H. 2004. Absorption, bioavailability, and metabolism of flavonoids. *Pharmaceutical Biology* 42 (SUPPL.):74-83.
- Hyson, D. A. 2011. A comprehensive review of apples and apple components and their relationship to human health. *Advances in Nutrition* 2 (5):408-420.
- Jeffery, I. B., O'Toole, P. W. 2012. Diet-microbiota interactions and their implications for healthy living. *Nutrients* 5 (1):234-252.
- 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 (1-2):216-222.
- Juge, N. 2012. Microbial adhesins to gastrointestinal mucus. *Trends in Microbiology* 20 (1):30-39.
- Kadlec, R., Křížová, L., Halová, D. 2011. In vitro modely adherence probiotik – přehled. *Mlékařské listy*. 124. 1-3.

- Kemperman, R. A., Bolca, S., Roger, L. C., Vaughan, E. E. 2010. Novel approaches for analysing gut microbes and dietary polyphenols: challenges and opportunities. *Microbiology-Sgm* 156:3224-3231.
- Kmeť, V., Drugdová, Z. 2012. Antimicrobial susceptibility of microflora from ovine cheese. *Folia Microbiologica*. 57. 291-293.
- 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.
- Laparra, J. M., Sanz, Y. 2010. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Pharmacological Research* 61 (3):219-225.
- Lee, H. C., Jenner, A. M., Low, C. S., Lee, Y. K. 2006. Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Research in Microbiology* 157 (9):876-884.
- Lee, J. H., Regmi, S. C., Kim, J. A., Cho, M. H., Yun, H., Lee, C. S., Lee, J. 2011. Apple flavonoid phloretin inhibits *Escherichia coli* O157:H7 biofilm formation and ameliorates colon inflammation in rats. *Infection and Immunity* 79 (12):4819-4827.
- Leontowicz, M., Gorinstein, S., Leontowicz, H., Krzeminski, R., Lojek, A., Katrich, E., Číž, M., Martin-Belloso, O., Soliva-Fortuny, R., Haruenkit, R., Trakhtenberg, S. 2003. Apple and pear peel and pulp and their influence on plasma lipids and antioxidant potentials in rats fed cholesterol-containing diets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (19):5780-5785.
- Licht, T. R., Hansen, M., Bergström, A., Poulsen, M., Krath, B. N., Markowski, J., Dragsted, L. O., Wilcks, A. 2010. Effects of apples and specific apple components on the cecal environment of conventional rats: Role of apple pectin." *BMC Microbiology* 10.
- Lu, L., Qian, D., Yang, J., Jiang, S., Guo, J., Shang, E. X., Duan, J. A. 2013. Identification of isoquercitrin metabolites produced by human intestinal bacteria using UPLC-Q-TOF/MS. *Biomedical Chromatography* 27 (4):509-514.
- Macfarlane, S., Woodmansey, E. J., Macfarlane, G. T. 2005. Colonization of mucin by human intestinal bacteria and establishment of biofilm communities in a two-stage continuous culture system. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (11):7483-7492.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. 2004. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition* 79 (5):727-747.
- Matthes, A., Schmitz-Eiberger, M. 2009. Polyphenol content and antioxidant capacity of apple fruit: Effect of cultivar and storage conditions. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 82 (2):152-157.

- Mikami, Y., Yamazawa, T. 2015. Chlorogenic acid, a polyphenol in coffee, protects neurons against glutamate neurotoxicity. *Life Sciences* 139:69-74.
- Noda, S., Tanabe, S., Suzuki, T. 2012. Differential effects of flavonoids on barrier integrity in human intestinal Caco-2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (18):4628-4633.
- Ojetti, V., Gigante, G., Ainora, M. E., Fiore, F., Barbaro, F., Gasbarrini, A. 2009. Microflora imbalance and gastrointestinal diseases. *Digestive and Liver Disease Supplements* 3 (2):35-39.
- Ondrejovič, M., Maliar, T., Polívka, L., Šilhar, S. 2009. Apple polyphenols. *Chemicke Listy* 103 (5):394-400.
- O'Neil, C. E., Nicklas, T. A., Fulgoni, V. L., III. 2015. Consumption of apples is associated with a better diet quality and reduced risk of obesity in children: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2003-2010. *Nutrition Journal* 14 (1).
- Ozdal, T., Sela, D. A., Xiao, J., Boyacioglu, D., Chen, F., Capanoglu, E. 2016. The reciprocal interactions between polyphenols and gut microbiota and effects on bioaccessibility. *Nutrients* 8 (2).
- Pan, P. H., Lin, S. Y., Wang, Y. Y., Chen, W. Y., Chuang, Y. H., Wu, C. C., Chen, C. J. 2014. Protective effects of rutin on liver injury induced by biliary obstruction in rats. *Free Radical Biology and Medicine* 73:106-116.
- Pan, W. H., Li, P. L., Liu, Z. 2006. The correlation between surface hydrophobicity and adherence of *Bifidobacterium* strains from centenarians' faeces. *Anaerobe* 12 (3):148-152.
- Park, S. Y., Kim, E. J., Shin, H. K., Kwon, D. Y., Kim, M. S., Surh, Y. J., Park, J. H. Y. 2007. Induction of apoptosis in HT-29 colon cancer cells by phloretin. *Journal of Medicinal Food* 10 (4):581-586.
- Parkar, S. G., Trower, T. M., Stevenson, D. E. 2013. Fecal microbial metabolism of polyphenols and its effects on human gut microbiota. *Anaerobe* 23:12-19.
- 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.
- Peng, X., Zhang, Z., Zhang, N., Liu, L., Li, S., Wei, H. 2014. In vitro catabolism of quercetin by human fecal bacteria and the antioxidant capacity of its catabolites. *Food and Nutrition Research* 58.

- 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.
- Ravindranath, M. H., Saravanan, T. S., Monteclaro, C. C., Presser, N., Ye, X., Selvan, S. R., Brosman, S. 2006. Epicatechins purified from green tea (*Camellia sinensis*) differentially suppress growth of gender-dependent human cancer cell lines. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 3 (2):237-247.
- Sakano, K., Mizutani, M., Murata, M., Oikawa, S., Hiraku, Y., Kawanishi, S. 2005. Procyanidin B2 has anti- and pro-oxidant effects on metal-mediated DNA damage. *Free Radical Biology and Medicine* 39 (8):1041-1049.
- Salem Alrawaiq, N., Abdullah, A. 2014. A review of flavonoid quercetin: Metabolism, Bioactivity and antioxidant properties. *International Journal of PharmTech Research* 6 (3):933-941.
- Salveti, E., Torriani, S., Felis, G. E. 2012. The Genus *Lactobacillus*: A Taxonomic Update. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 4 (4):217-226.
- Sanders, M. E. 2008. Probiotics: Definition, Sources, Selection, and Uses. *Clinical Infectious Diseases* 46 (Supplement 2):S58-S61.
- Shahidi, F., Ambigaipalan, P. 2015. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review. *Journal of Functional Foods* 18:820-897.
- Sun, X., Chen, R. C., Yang, Z. H., Sun, G. B., Wang, M., Ma, X. J., Yang, L. J., Sun, X. B. 2014. Taxifolin prevents diabetic cardiomyopathy in vivo and in vitro by inhibition of oxidative stress and cell apoptosis. *Food and Chemical Toxicology* 63:221-232.
- Tabasco, R., Sanchez-Patan, F., Monagas, M., Bartolome, B., Moreno-Arribas, M. V., Pelaez, C., Requena, T. 2011. Effect of grape polyphenols on lactic acid bacteria and bifidobacteria growth: Resistance and metabolism. *Food Microbiology* 28 (7):1345-1352.
- Tsao, R., Yang, R., Xie, S., Sockovie, E., Khanizadeh, S. 2005. Which polyphenolic compounds contribute to the total antioxidant activities of apple? *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (12):4989-4995.
- Valentová, K., Vrba, J., Banciřová, M., Ulrichová, J., Křen, V. 2014. Isoquercitrin: Pharmacology, toxicology, and metabolism. *Food and Chemical Toxicology* 68:267-282.

- Viskupičová, J., Ondrejovič, M., Šturdík, E. 2008. Bioavailability and metabolism of flavonoids. *Journal of Food and Nutrition Research* 47 (4):151-162.
- Volšátová, T., Havlík, J., Doskočil, I., Geigerova, M., Rada, V. 2015. Effect of hydrolyzed milk on the adhesion of lactobacilli to intestinal cells. *Scientia agriculturae bohemia*, 46(1), 21-25.
- Volšátová, T., Havlík, J., Potůčková, M., Geigerova, M. 2016. Milk digesta and milk protein fractions influence the adherence of *Lactobacillus gasseri* R and *Lactobacillus casei* FMP to human cultured cells. *Food & Function*, 7(8), 3531-3538.
- Wolfe, K., Wu, X., Liu, R. H. 2003. Antioxidant activity of apple peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (3):609-614.
- Xu, H., Jeong, H. S., Lee, H. Y., Ahn, J. 2009. Assessment of cell surface properties and adhesion potential of selected probiotic strains. *Letters in Applied Microbiology* 49 (4):434-442.
- Yun, J. K., Sun, E. C., Min, W. L., Chung, S. L. 2008. Taxifolin glycoside inhibits dendritic cell responses stimulated by lipopolysaccharide and lipoteichoic acid. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 60 (11):1465-1472.
- Zhang, Q., Hu, L. Q., Yin, C. S., Chen, P., Li, H. Q., Sun, X., Yan, G. 2014. Catechin ameliorates cardiac dysfunction in rats with chronic heart failure by regulating the balance between Th17 and Treg cells. *Inflammation Research* 63 (8):619-628.
- Zhang, X. A., Zhang, S., Yin, Q., Zhang, J. 2015. Quercetin induces human colon cancer cells apoptosis by inhibiting the nuclear factor-kappa B Pathway. *Pharmacognosy Magazine* 11 (42):404-409.

## 9 Seznam použitých zkratek

AT	Rakouská republika
CZ, ČR	Česká republika
DE	Spolková republika Německo
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's médium
DMSO	dimetylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
FBS	fetální bovinní sérum
FITC	fluorescein isothiokyanát
FMP	fermentovaný mléčný produkt
FR	Francouzská republika
IC <sub>50</sub>	koncentrace způsobující 50% inhibici růstu buněk
KTJ	kolonie tvořící jednotka
<i>L.</i>	<i>Lactobacillus</i>
MRS	Man, Rogosa a Sharpe
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid
MTX	methotrexát
NL	Nizozemsko
PBS	fosfátový pufr
R	Rudolf (jméno kojence, z jehož vzorku stolice byl izolován bakteriální kmen)
UK	Spojené království
USA	Spojené státy americké