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



Adherence mikroorganismů v modelu střevního epitelu

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Helena Mišurová

Obor studia: Výživa a potraviny

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

Konzultant práce: Ing. Veronika Jarošová

Čestné prohlášení Prohlašuji, že svou diplomovou práci *Adherence mikroorganismů v modelu střevního epitelu* jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 12. dubna 2018

.....
Bc. Helena Mišurová

Poděkování Ráda bych touto cestou poděkovala *Ing. Ivo Doskočilovi, Ph.D.* za vedení práce, nespočet odborných konzultací, vřelost a cenné rady, které mi pomohly tuto práci zkompletovat a také *Ing. Veronice Jarošové* za trpělivost a ochotu.

Adherence mikroorganismů v modelu střevního epitelu

Souhrn

Schopnost mikrobiómu adherovat na střevní epitel je jednou ze základních a nejcennějších vlastností, které probiotika mají. Tato vlastnost může být ovlivněna různými složkami stravy, mezi které patří také fenolové sloučeniny. Fenolové sloučeniny mají antioxidační vlastnosti, jsou schopné vyvazovat volné radikály a tím působit preventivně v celé řadě onemocnění jako jsou nádorová onemocnění, chronické záněty, srdeční choroby, neurodegenerativní onemocnění, Kronova choroba nebo ulcerativní kolitida. Mechanismus účinků těchto fenolových sloučenin je však předmětem zájmu celé řady vědeckých skupin a to včetně jejich vlivu na střevní mikrobiom, zejména však na probiotické kmeny *Lactobacillus* spp. a *Bifidobacterium* spp.

Adherenční vlastnosti probiotik je možné testovat pomocí *in vitro* metody využívající směsnou buněčnou kulturu Caco-2 a HT29-MTX, kdy se jejich pomocí simuluje lidské střevo s produkcí mucinu. Tato buněčná směs je kultivována minimálně 14 dní při 37 °C a 5 % CO₂, než vytvoří mikrokly. Nejprve bylo pomocí testu cytotoxicity, využívající tetrazoliovou sůl MTT, stanoveno bezpečné množství resveratrolu na buněčný model. K buněčnému modelu po 14 dnech byl přidán resveratrol s vybraným kmenem laktobacila na dobu 2 hodin. Po této inkubaci byly buňky sklizeny pomocí 1% TRITONU a následně rozpuštěny ve fosfátovém pufru. Takto připravená suspenze je pipetována na Petriho misku a přelita ROGOSA agarem. Petriho misky se nechaly inkubovat 72 hodin s následným spočítáním kolonií.

Z testu cytotoxicity byla stanovena nejvyšší bezpečná koncentrace resveratrolu, kdy bylo IC₅₀ 13,60 ± 0,16 µg/ml a IC₁₀ 3,56 ± 0,36 µ/ml. Celkově dále byly testovány 2 kmeny laktobacilů a to *Lactobacillus fermentum* a *Lactobacillus plantarum*. Ani jeden kmen s resveratrolem statisticky významně nezvedl adhezi. Naopak u *Lactobacillus plantarum* se schopnost adheze při koncentracích resveratrolu 1,12–4,5 µg/ml snížila o 3,0–3,5 %.

Z výsledků je patrné, že resveratrol nemá pozitivní účinky na adhezní vlastnosti laktobacilů a nelze říci, že by se jeho konzumací zvyšoval celkový počet námi testovaných kmenů ve střevním mikrobiomu.

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

Adherence of microorganisms in the intestinal epithelium model

Conclusion

The ability of the microbioma to adhere to the intestinal epithelium is one of the basic and most valuable properties of probiotics. The capability of it can be affected by various dietary ingredients, including phenolic compounds. Phenols for their antioxidant properties including the ability of binding free radicals and preventively acting in a variety of diseases such as cancer, chronic inflammation, heart disease, neurodegenerative disease, Kron's disease or ulcerative colitis. However, the mechanism of action of these phenolic compounds bring the attention to a wide range of scientific groups, including their effects on intestinal microbes, especially on probiotic strains of *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp.

The adhesion properties of probiotics can be tested by an *in vitro* method, which is using the Caco-2 and HT29-MTX mixed cell cultures to simulate the human intestine with mucin production. This cell mixture has to be cultured for at least 14 days at 37 °C and 5 % CO₂ before they create mikrols. At first the Cytotoxicity experiments have to utilized MTT tetrazolium salt to determine a safe amount of resveratrol to the cellular model. A resveratrol with a selected lactobacillus strains was added to the cell model after 14 days for 2h. After this incubation period, the cells have to be harvested with 1% TRITON and subsequently dissolved in phosphate buffer. The suspension thus prepared is pipetted into a petri dish and poured over ROGOSA agar. Petri dishes were incubated for 72h followed by counting the colonies.

The highest safe resveratrol concentration was determined from the cytotoxicity experiment where the IC₅₀ was $13.60 \pm 0.16 \mu\text{m/ml}$ and IC₁₀ was $3.56 \pm 0.36 \mu\text{g/ml}$. At the end, 2 strains of lactobacilli — *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus plantarum* were tested. Neither of the strains with resveratrol detected adhesion in any statistical importance. However the *Lactobacillus plantarum* reduced it by 3.00–3.50 % at resveratrol concentrations of 1.12–4.50 $\mu\text{g/ml}$.

It can be seen that the results show that reveratrol does not have a positive effect on the adherence function of lactobacilli, and it can not be said that its consumption would increase the total number of strains tested in the intestinal microbe.

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

Obsah

1 Úvod	3
2 Cíl práce	4
3 Literární rešerše	5
3.1 Střevní mikrobiom	5
3.1.1 Vývoj mikrobiomu během života	6
3.1.2 Role mikrobiomu na onemocnění	7
3.2 Probiotika	8
3.2.1 Charakteristika a mechanismus působení	8
3.2.2 Kmeny probiotik	10
3.2.3 Prebiotika	11
3.2.4 Symbiotika	11
3.3 Rostlinné fenolové sloučeniny	12
3.3.1 Metabolismus a biologická dostupnost fenolových sloučenin	13
3.3.2 Rozdělení fenolových sloučenin	14
3.3.3 Resveratrol	16
4 Materiál a metody	19
4.1 Materiál	19
4.2 Metody	19
4.2.1 Příprava bakteriální suspenze	19
4.2.2 Příprava resveratrolu	20
4.2.3 Kultivace buněčných linií	20
4.2.4 Založení 24 a 96 jamkové destičky	20
4.2.5 Test životaschopnosti	20

4.2.6	Adhezní testy	21
4.2.7	Statistická analýza	21
5	Výsledky	22
6	Diskuze	24
7	Závěr	31
	Seznam zkratek	51
	Seznam obrázků	52
	Rejstřík	53

Kapitola 1

Úvod

Střevní mikrobiom je součástí lidského života téměř od narození, kdy se postupně vyvíjí, bývá v symbióze a přináší hostiteli pozitiva. Ty spočívají v rozkladu oligosacharidů v tlustém střevě, syntéze vitamínů, zároveň také mají schopnost integrovat s buňkami imunitního systému a podílet se na celkové imunitě. Z tohoto důvodu se střevní mikrobiom dostal do popředí zájmu mnoha vědeckých skupin, které se zabývají jeho interakcí s hostitelem případně s různými složkami potravy.

Střevní mikrobiom bývá podpořen probiotiky přítomnými v lidské potravě. A jejich výběr je založený také na adhezenčních vlastnostech jednotlivých kmenů. Tyto adhezenční vlastnosti mohou být ovlivněny celou řadou elementů.

Mezi takové patří i fenolové sloučeniny přítomné v ovoci a zelenině, které primárně slouží jako exogenní antioxidanty. U probiotik však mohou pozitivně ovlivňovat jejich adhezenční vlastnosti a podporovat tak jejich kolonizaci lidských střev.

Mezi tyto fenolové sloučeniny patří i stilbeny, které se vyskytují v celé řadě rostlin, a však nejznámějším druhem je réva viná a z ní vyrobené červené víno, které je bohatým zdrojem resveratrolu. Ten je běžně se vyskytujícím stilbenem v rostlinách a má vliv na celou řadu onemocnění jako jsou nádorová onemocnění, neurodegenerativní onemocnění a také ischemická choroba srdeční.

Z tohoto důvodu nás zajímá, zda takto bohatě konzumovaná bioaktivní sloučenina může mít i pozitivní vliv na střevní mikrobiom a adhezenční vlastnosti probiotik.

Kapitola 2

Cíl práce

Cílem diplomové práce je v teoretické části zpracování literární rešerše zaměřené zejména na lidský mikrobiom, probiotika a fenolové sloučeniny. Cílem praktické části diplomové práce je testování schopnosti vybraných perspektivních kmenů laktobacilů adherovat v přítomnosti dietárních fenolových sloučenin.

Primárním cílem praktické části bylo stanovení účinku resveratrolu na adhezi dvou potenciálních probiotických kmenů *Lactobacillus* (*Lactobacillus plantarum* a *Lactobacillus fermentum*) v modelu epitelových buněk tlustého střeva. Sekundárním cílem bylo posoudit adhezní potenciál dvou potenciálně probiotických kmenů v modelu Caco-2/HT29-MTX. Podle našeho názoru je to první studie zaměřená na adhezi bakterií v tomto modelu za přítomnosti resveratrolu.

Hypotézou je, že přítomnost vybraných dietárních fenolových sloučenin zvyšuje adhezi určitého perspektivního probiotického kmene.

Kapitola 3

Literární rešerše

3.1 Střevní mikrobiom

Střevní mikrobiom (Obr. 3.1) se skládá z mikroorganismů s počtem dosahujícího až 10^{14} , což je o jeden řád více než je počet eukaryotických buněk v těle. Tento střevní mikrobiom je ovlivňován řadou faktorů, mezi které patří například způsob porodu, kojení, strava, zdravotní stav a užívání léků. Během života se mikrobiom mění a po celou dobu je specifický pro každého jedince. Bylo zjištěno, že lidskou populaci lze rozdělit do tří střevních skupin neboli enterotypů. U každého enterotypu dominuje jiný bakteriální kmen (Guarner & Malagelada 2003).



Obrázek 3.1: Střevní mikrobiom

Mikrobiom přítomný v lidském gastrointestinálním (GI) traktu, je složen z tisíce komensálních, případně symbiotických mikrobiálních druhů, mezi které patří viry (včetně bakteriofágů), bakterie, *Archaea*, jednobuněčná eukaryota, a další nebakteriální a mikrobiální druhy

(Ley 2001, Lagier et al. 2016). Bylo zjištěno, že střevní mikrobiom u dospělé osoby má velkou interindividuální variaci s více než 1 000 různými bakteriálními druhy (Guinane & Cotter 2013). Bacteroidetes a Firmicutes podle analýzy RNA představují 90 % bakteriálních druhů nacházejících se ve střevě, stejně jako Proteobacteria (Guinane & Cotter 2013), které jsou gramnegativní a podílejí se na trávení sacharidů, vývoji střevního mikrobiomu, modulaci imunitního systému a ochraně proti kolonizaci patogenními organismy (Russell et al. 2014). Některé Firmicutes patří mezi grampozitivní bakterie, které mají schopnost extrahovat sacharidy (Berry 2016). Lidská *Archaea*, mezi která patří *Methanobrevibacter smithii*, se objevují u téměř 96 % zdravých jedinců, jsou schopné syntetizovat metan z H_2 produkovaného prostřednictvím bakteriálního katabolismu (Hoffmann et al. 2013). Střevní mikrobiom je tvořen také různými druhy hub, mezi které patří *Saccharomyces*, *Candida* a *Cladosporium*, a dalšími kmeny, které jsou však zastoupeny jen minimálně (Hoffmann et al. 2013). *M. smithii*, *Saccharomyces* a *Candida* jsou často přítomné u osob, které mají stravu velmi bohatou zejména na sacharidy (Hoffmann et al. 2013).

3.1.1 Vývoj mikrobiomu během života

Kolonizace trávicího traktu mikrobiomem nastává již při porodu. Je důležité, zda jde o porod vaginální nebo pomocí cířaského řezu (Marques et al. 2014). U porodu, probíhajícího cířaským řezem, dochází u dítěte k expozici nejdříve mikroby matčiny kůže, kde dominuje *Corynebacterium*, *Staphylococcus* a *Propionibacterium* spp. s nižším počtem *Bifidobacteria* spp. Zatímco u běžných vaginálních porodů dochází ke kolonizaci střeva poševními a fekálními bakteriemi (*Lactobacillus* spp.) U předčasně narozených dětí převládají v mikrobiomu Proteobacteria s menším zastoupením *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* (O'Mahony et al. 2015), později se však rozdíl ve střevním mikrobiomu vyrovnávají na běžné složení.

Novorozenec však ale není vystaven pouze těmto bakteriím, ale také bakteriím, které se vyskytují v okolním prostředí. Těm, které pocházejí od nemocničního personálu, ostatních novorozenců, ze vzduchu, z přístrojů atd. V novorozeneckém období je střevní mikrobiom nestálý a k jeho ustálení a vyvážení dochází postupně. Je ovlivňován kojením, které utváří mikrobiom pomocí oligosacharidů přítomných v mateřském mléce, které obsahuje také cytokiny, lysozymy a laktoferiny, které jsou důležité pro optimální vývoj a utváření střevního epitelu a jsou pro mikrobiom nepostradatelné. Tyto oligosacharidy mateřského mléka (prebiotika) slouží jako stimulanty pro optimální růst zdravých prospěšných bakterií, a to zejména bifidobakterií (Marques et al. 2014). Mezi druhým a třetím rokem života dítěte dochází ke stabilizaci složení nejdůleži-

tějších bakteriálních skupin (Tlaskalová & Městský 2012). Po ukončení období kojení se mění složení střevního mikrobiomu především kvůli přechodu na pevnou stravu. Dochází ke zvyšování celkového počtu Bacteroidetes a Firmicutes a mikrobiom se začíná výrazněji podobat mikrobiomu dospělého jedince (Marques et al. 2014).

Děti narozené přirozenou cestou, nemají stejné složení mikrobiomu. Mají relativně stabilní jádro mikrobiomu, ale počet příležitostných střevních mikrobů se značně liší v závislosti na různých faktorech: onemocnění, která jedinec prodělá, podávání léků (zejména antibiotik), ale i ve složení stravy člověka (Marques et al. 2014).

3.1.2 Role mikrobiomu na onemocnění

Určitá rovnováha mezi různými mikrobiálními skupinami je pro zdraví hostitele velmi důležitá a patologické změny v této rovnováze jsou definovány jako dysbiózy. Dysbióza je nerovnováha ve střevním mikrobiomu, kdy se poruší normální složení bakteriální flóry (Tamboli et al. 2004). Bez ohledu na jejich příčinu, dysbióza koreluje s různými patologickými stavy hostitele, jako jsou například zánětlivá onemocnění střev, idiopatické střevní záněty (Inflammatory Bowel Disease — IBD) nebo diabetes typu 1, revmatoidní artritida, astma, obezita a další (Keeney et al. 2014). Složení střevní mikroflóry může mít vliv na duševní zdraví (Moos et al. 2016) a pravděpodobně také na vznik nádorového onemocnění (Yamamoto & Matsumoto 2016), které se může vyvinout v reakci na epiteliální poranění, zánět nebo na nějaké infekční původce nebo patogeny například na *Helicobacter pylori*, *Salmonella enterica*, *Borrelia burgdorferi*, *Chlamydia psittaci* (Schwabe & Jobin 2013).

Obrovský povrch trávicího traktu a jeho úloha při vstřebávání živin je základem pro integritu a zdraví organismu, které musí být neustále pod dozorem imunitního systému. Během infekce vrozená imunita a rezidentní mikrobiom spolupracují na aktivním přemístění patogenů přes antimikrobiální molekuly a zabraňují tak připevnění patogenů na střevní výstelku. Současně je vztah hostitel – mikrobiota podporován sekrecí fukosylovaných molekul z povrchu střevních epiteliálních buněk, které upřednostňují rezidentní mikroby (Pickard et al. 2014). Bylo zjištěno, že mikrobiom může modulovat expresi chuťových receptorů (Murtaza et al. 2017) a ovlivňovat uvolňování toxinů a neurotransmiterů (Clarke et al. 2014). Tím může docházet k redukci chuti jedince a změnit tím stravovací návyky (Kadooka et al. 2010). Mikrobiom má také vliv na diabetes 1. typu, jedná se o autoimunitní onemocnění pankreatických β -buněk (normálně produkující inzulín) u geneticky predisponovaných jedinců. U těchto osob došlo k vadnému

vývoji a nebo výrazné změně mikrobiomu, která mohla mít za následek dysregulaci imunity s destrukcí autoimunitních β -buněk případně zvýšenou netěsností střevní epiteliální bariéry. U této nemoci je snižená mikrobiální diverzita (Atkinson et al. 2014).

Střevní mikrobiota, případně dysbióza nebo onemocnění se dá obnovit nebo upravit transplantací fekálních mikrobiálních mikroorganismů (FMT). U FMT je intestinální mikrobiota získaná od zdravého dárce, zpracována, standardizována a nakonec transplantována do střeva příjemce. FMT se zvažuje jako alternativa antibiotické terapie k léčbě chronických infekcí *Clostridium difficile*, které se vyskytují u dysbióz.

Dalším onemocněním, při kterém hraje roli mikrobiom, je astma. Při něm je mikrobiom dýchacích cest během vývoje bronchitidy a pneumonie výrazně ovlivněn výskytem *Chlamydomphila pneumoniae*. GI mikrobiota je ovlivněna vystavením mikroorganismů v životním prostředí, obzvláště po narození, což zase ovlivňuje zrání imunitních funkcí k ochraně před alergickou senzibilizací (Hahn et al. 1991).

3.2 Probiotika

3.2.1 Charakteristika a mechanismus působení

Střevní mikrobiom představuje dynamický a vysoce hustý ekosystém, který obsahuje přibližně 500–1 000 mikrobiálních druhů. Tento mikrobiální ekosystém je důležitý pro řadu funkcí, které ovlivňují lidské zdraví, včetně udržování střevní homeostázy (Guarner & Malagelada 2003). Zdravá mikrobiota může být považována za dobrý zdroj budoucích probiotik, mezi které patří některé specifické bakterie mléčného kvašení (LAB). Ty jsou považovány za probiotika, které byly definovány jako „živé mikroorganismy, které při podávání v přiměřených množstvích poskytují hostiteli příznivý zdravotní účinek“ (Palmer et al. 2007). *Lactobacillus* patří mezi LAB nejčastěji orálně používaná probiotika. Předpokládá se, že dočasně kolonizují střeva, a to adhezí na povrch střevního epitelu. Proto je adheze ke střevní sliznici považována za jedno z hlavních kritérií pro výběr potenciálních probiotik, neboť může zvýšit jejich stálost ve střevě (Palmer et al. 2007). Dále také probiotika pozitivně ovlivňují hostitele prostřednictvím modulační slizniční a systémové imunity. Při požívání probiotik proto dochází ke zlepšení nutriční a mikrobiální rovnováhy ve střevním traktu (Montrose & Floch 2005).

Probiotika jsou obažena v tradičních fermentovaných potravinách, které jsou bohaté na živé mikroorganismy (např. kysané zelí, kimchi, jogurt) nebo potravinové doplňky (Voreades et al.

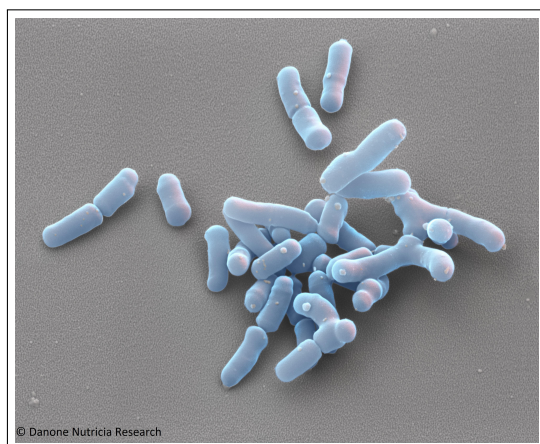
2014), které jsou používány k podpoře proliferace mikroorganismů (Saxelin et al. 2010).

Potraviny s rostlinným materiálem jsou bohaté na bioaktivní sloučeniny, které mohou s probiotiky integrovat společně s hostitelskými buňkami a následně ovlivňovat cesty intracelulární signální transdukce. Kromě toho mohou sekretované bakteriální produkty (např. peptidy, mastné kyseliny s krátkým řetězcem, bakteriociny, oxid dusnatý) a neživé strukturní složky (např. DNA, proteiny) zprostředkovat specifické reakce hostitele (Jijon et al. 2004). Mimo bioaktivních sloučenin je v rostlinách přítomná i vláknina, která obsahuje celulózu, podobnou svým složením oligosacharidům. Vláknina není trávená v tenkém střevě, ale prochází do tlustého střeva. Zatímco některé složky vlákniny procházejí hydrolýzou a fermentací bakteriemi tlustého střeva, jiné složky — polysacharidy, jako je rezistentní škrob, pektin, inulin, guarová guma a oligosacharidy, zůstávají nezměněny (Cummings & Macfarlane 1997). Naproti tomu strukturní polysacharidy, jako je celulóza a lignin, jsou obvykle složkami komplexní vlákniny, které jsou nerozpustné ve vodě a jsou stěží degradovány střevními bakteriemi během jejich průchodu trávicí trubicí. Obecně platí, že obě vlákniny, jak fermentovatelná i nefermentovatelná, mají zvlhčující účinek, což má za následek zvýšené množství fekálního produktu. V případě fermentovatelné vlákniny závisí rozsah objemu od vlastní hmoty nebo kapacity zadržování vody. Mimo to vláknina, která je součástí ovoce a zeleniny, chrání před vznikem kolorektálního karcinomu (Potter et al. 1993). Na základě těchto údajů se doporučuje denní příjem vlákniny nejméně 30 g. Toto doporučení bylo potvrzeno navzdory zdánlivě protichůdným výsledkům tzv. „Studie zdravotních sester“ (Fuchs et al. 1999).

Přestože mechanismy adheze probiotik nejsou plně pochopeny, byly proteinové složky zdůrazněny jako klíčové, podléjí se totiž na adhezi bakterií na střevní mucin případně na epiteliální buňky. Proteiny navázané na hlenovou vrstvu a manoso-specifické adheziny jsou příklady důležitých efektorových molekul zahrnujících adhezi laktobacilů k hostiteli. Byly identifikovány nové proteiny, které sekretuje *L. plantarum*, přispívající k adhezi (Vélez et al. 2007). Bylo prokázáno, že heterologní exprese kolagenu vázajícího protein Cnb u *L. casei* zvyšuje jeho schopnost adheze na Caco-2 buňky, ale také vede k vyšší konkurenční výhodě oproti *Escherichia coli* a *Listeria monocytogenes*. Obdobně přispívá jak ke specifické, tak nespecifické adhezi exopolysacharidy lipoteichoová kyselina (Lebeer et al. 2008).

3.2.2 Kmeny probiotik

Mezi nejvýznamnější kmeny probiotik patří *Bifidobacteria* spp. První bifidobakterie byly izolovány a popsány již v letech 1899–1900 Tissierem, který popsal tyčkovité anaerobní mikroorganismy přítomné ve stolici kojenečků, které nazval *Bacillus bifidus*. Bifidobakterie jsou obecně charakterizovány jako gram-pozitivní, nesporeující, nemotální a katalázově negativní anaeroby (Sgorbati et al. 1995), které ani během růstu netvoří plyn. Mají různé tvary včetně krátkých, zakřivených prutů, prutů ve tvaru klínu a rozvětvených prutů ve tvaru písmene „Y“ (příklady tvarů bifidobakterií jsou na obrázcích 3.2a a 3.2b) (Lilly & Stillwell 1965).



(a) breve



(b) bifidum

Obrázek 3.2: Bifidobacterium

V současné době je do rodu Bifidobacterium zahrnuto 30 druhů, z nichž 10 je z lidských zdrojů (zubní kaz, stolice a vagina), 17 ze střev živočichů nebo z bahna, 2 z odpadních vod a 1 z fermentovaného mléka (Parker 1974). Nejlépe rostou při pH 6–7 a optimální růstová teplota je 37–41 °C. Komplexní detaily jejich biologie jsou k dispozici v rozsáhlých studiích (Rasic & Kurmann 1983, Sgorbati et al. 1995).

Dalším hojně využívaným probiotikem je *Lactobacillus* spp. Tyto laktobacily jsou charakterizovány jako gram-pozitivní, neporézní tyčinky nebo koky, které se shlukují do krátkých řetězků nebo palisád. Jedná se buď o aerotolerantní nebo anaerobní a přísně fermentativní bakterie (Mital & Garg 1992). V lidském těle je najdeme vždy tam, kde se nachází dostatek sacharidů, např. ve sliznici vagíny, střeva, nebo v dutině ústní (Hammes & Vogel 1995). V současné době bylo uznáno 56 druhů rodu *Lactobacillus*. Z těchto mikroorganismů jsou nejčastěji doporučovány pro dietní použití kmeny *L. acidophilus*. Některé laktobacily se používají při výrobě jogurtů, sýrů, kysaného zelí, kvašených okurek, piva, cideru, vína, a dalších typů fermentova-

ných (kvašených) potravin (Nahaisi 1986). Homofermentativně rozkládají glukózu na mléčnou kyselinu nebo heterofermentativně na ekvimolární množství mléčné kyseliny, CO₂ a ethanol (a/nebo octovou kyselinu). Na základě konečných produktů fermentace se laktobacily dělí do třech skupin. Obligátně heterofermentativní, ti rozkládají glukózu na mléčné a octové kyseliny, ethanol a CO₂. Do této skupiny řadíme *L. buchneri*, *L. brevis*, *L. kefir*, *L. fermentum*, *L. panis*. Obligátně homofermentativní fermentují glukózu jen na mléčnou kyselinu, patří sem *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. delbrueckii*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. salivarius*. Jako poslední je skupina fakultativně heterofermentativních laktobacilů, tato skupina má dvě metabolické dráhy. Buď laktobacily fermentují glukózu na kyselinu mléčnou nebo pokud jsou limitovány kyslíkem, produkují směs mléčné, octové a mravenčí kyseliny a ethanolu. K této skupině zařadíme *L. curvatus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. rhamnosus* (Nielsen & Gilliland 1992).

3.2.3 Prebiotika

Prebiotikum bylo definováno jako „nestravitelná složka potravy, která příznivě ovlivňuje hostitele výběrovým stimulačním růstem anebo aktivitou jednoho nebo omezeného počtu bakterií v tlustém střevě“ (Gibson & Roberfroid 1995). Prebiotika mají za cíl modifikovat střevní mikrobiom tak, že stimuluje jeho bakteriální aktivitu, která je pro hostitele výhodná, a bakteriální aktivita, která je pro zdraví hostitele nepříznivá se naopak potlačuje. Koncepce prebiotik vznikla z pozorování selektivní stimulace inulinu a fruktooligosacharidů na růst bifidobakterií (Gibson et al. 1995). Ačkoli většina výzkumů proběhla u inulinu a fruktooligosacharidů, byly samozřejmě také testovány i jiné nestravitelné oligosacharidy včetně xylooligosacharidů, galaktooligosacharidů a izomaltooligosacharidů na jejich prebiotický účinek (VanLoo et al. 1999). Většina kandidátních prebiotik jsou oligosacharidy, ale také polysacharidy. Aby prebiotikum sloužilo jako bakteriální substrát v tlustém střevě, nesmí být hydrolyzováno nebo absorbováno v horní části gastrointestinálního traktu.

3.2.4 Symbiotika

Symbiotikum je výsledkem kombinace prebiotik a probiotik. Například pravidelné a dlouhodobé užívání různých symbiotik prokázalo, že se zlepšuje zdraví dospělých tím, že se snižuje výskyt a závažnost respiračních onemocnění během chladné sezóny (Pregliasco et al. 2008), což naznačuje synergický účinek probiotických i prebiotických složek. Symbiotika by mohla

pozměňovat složení střevního mikrobiomu, snižovat zánětlivé procesy ve sliznici střev a mohla by být schopna vyvolat remisi onemocnění při zánětlivém střevním onemocnění (Steed et al. 2008).

3.3 Rostlinné fenolové sloučeniny

Rostlinné fenolové sloučeniny se dostávají do popředí zájmů pro své antioxidační vlastnosti. Tyto sloučeniny se bohatě vyskytují v ovoci a zelenině a první byly izolovány již v roce 1930, kdy se původně myslelo, že se jedná o vitamín P. Později se ukázalo, že se jedná o flavonoid (rutin) a není to tudíž vitamín v pravém slova smyslu (Nijveldt et al. 2001). To vedlo k řadě výzkumů, s cílem izolovat další fenolové sloučeniny a prostudovat jejich mechanismy působení. Celkem je známo více jak 8 000 rozličných struktur, které lze rozdělit na fenolové kyseliny (mono-, di-, tri-hydroxybenzoové kyseliny a deriváty skořicové kyseliny), stilbeny, lignany a flavonoidy (flavonoly, flavony, flavanoly, flavanony, isoflavony, antokyanidiny). Jednotlivé skupiny se od sebe liší počtem fenolových kruhů (Manach et al. 2005). Na rozdíl od tradičních vitamínů nejsou esenciální. Zatímco vitamíny mají v těle vytvořeny speciální mechanismy pro jejich zadržování, fenolové sloučeniny jsou zpracovávány jako xenobiotika (Lugasi & Hóvári 2003). Fenolové sloučeniny zvyšují biologickou hodnotu potravin, ve kterých se vyskytují a jsou nositeli kvality, na jejímž základě mohou být potraviny označovány jako „funkční“ (Kaur & Kapoor 2001).

U ovoce a zeleniny jsou fenolové sloučeniny významným prvkem, podílejícím se na jejich jakosti, ovlivňují chuť, barvu a nutriční složení (Cheynier 2005). Obsah fenolových sloučenin v potravinách závisí na kultivačních technikách rostlin, kultivarech, podmínkách růstu, procesu zrání, zpracování ovoce či zeleniny a na způsobu jejich skladování. Například loupání, krájení, vaření a smažení cibule může redukovat celkový obsah kvercetinu až o 75 % (Naczjk & Shahidi 2006). Denní příjem fenolových sloučenin se pohybuje kolem hodnoty 1 g (Scalbert & Williamson 2000). Doporučený denní příjem flavonoidů by se měl pohybovat kolem 25 μ /den (Haidari et al. 2008). Takový příjem je výrazněji vyšší, než příjem antioxidačních vitamínů (Scalbert & Williamson 2000).

3.3.1 Metabolismus a biologická dostupnost fenolových sloučenin

Z celkového příjmu je 5–10 % fenolových sloučenin přímo absorbováno v tenkém střevě po dekonjugčních reakcích, jako je deglykosylace. Po absorpci jsou tyto méně složité fenolové sloučeniny podrobeny rozsáhlé fázi I (oxidace, redukce a hydrolýza) a potom biotransformaci, tedy fázi II (konjugace) v enterocytech a potom hepatocytech, což vede ke vzniku rady ve vodě rozpustných konjugovaných metabolitů (methyl, glukuronid a sulfátové deriváty), které se rychle uvolňují do systémového oběhu, jsou distribuovány do orgánů a vylučovány močí.

Je známo, že bakterie v tlustém střevě působí na fenolové sloučeniny enzymaticky (90–95 % z celkového příjmu fenolových sloučenin), čímž postupně produkují metabolity s různým fyziologickým významem (Zamora-Ros et al. 2012). V tomto procesu se uplatňuje střevní mikrobiom, který štěpí glykosidické vazby.

Štěpení proanthokyanidinů (oligomerů a polymerů flavan-3-olu) pomocí mikrobiomu bylo již značně popsáno. Postupně se tvoří laktony, aromatické a fenolické kyseliny s různými hydroxylačními vzorci a délkami vedlejších řetězců, v závislosti na prekurzorových strukturách (fenylvalerolaktony, fenylvalerové kyseliny, fenylpropionové kyseliny, fenylacetové kyseliny, hippurové a benzoové kyseliny) (Boto-Ordóñez et al. 2011).

Metabolismus fenolových sloučenin bývá často ovlivněn tkáňovou expozicí fenolových sloučenin s vysokou molekulovou hmotností včetně proantokyanidinů nebo oxidovaných polymerních sloučenin, které jsou špatně absorbovány v proximální části gastrointestinálního traktu (Santos-Buelga & Scalbert 2000). Kromě toho byla v posledním desetiletí zkoumána i mikrobiální transformace neflavonoidních polymerních molekul nazývaných ellagitaniny (nebo hydrolyzovatelné taniny).

Po konzumaci potravin bohatých na ellagitanin, jako jsou jahody, maliny, vlašské ořechy, dubová vína a granátová jablka, se tyto taninové struktury podrobí hydrolýze ve střevní stěně a uvolní se volná ellagická kyselina. V tlustém střevě se ellagická kyselina metabolizuje mikrobiomem za vzniku řady derivátů sloučenin nazývaných urolitiny, které jsou charakterizovány běžným jádrem 6H-dibenzo [b, d] pyran-6-onu a snižujícím se počtem fenolových hydroxylových skupin (urolithin D → C → A → B). Všechny tyto fenolové metabolity pocházející z mikrobiálních látek mohou být absorbovány nebo vylučovány stolicí.

Po vstřebání se dostávají játry přes portální žílu, kde mohou být dále podrobeny rozsáhlému metabolismu první fáze a druhé fáze (včetně glukuronidace, metylace, sulface nebo jejich kombinace), dokud se nakonec nedostanou do systémové cirkulace, do orgánů nebo se pak vyloučí

močí.

Clostridium a *Eubacterium* jsou hlavní rody podílející se na metabolismu mnoha fenolů, jako jsou isoflavony (daidzein), flavonoly (quercetin a kaempferol), flavony (naringenin a ixoxanthumol) a flavan-3-oly (katechin a epicatechin) (Selma et al. 2009).

Jelikož *Firmicutes* mají disproporčně menší počet enzymů degradujících glykany než *Bacteroidetes*, lze předpokládat, že příjem různých fenolových sloučenin různě mění složení střevního mikrobiomu (Selma et al. 2009).

3.3.2 Rozdělení fenolových sloučenin

Nejpočetnější skupinou z fenolových sloučenin jsou flavonoidy vyskytující se výhradně v rostlinách, nejčastěji ve formě glykosidů. Z chemického hlediska se jedná o skupinu různorodých látek, jejichž základ tvoří jedno, či více aromatických jader (mnohdy s heterocyklickou strukturou), na něž se váže několik fenolových skupin (Balasundram et al. 2006).

Deriváty flavonoidů, které se vyskytují volně v přírodě — tzv. bioflavonoidy — jsou odvozeny od heterocyklu flavanu.

Antioxidační účinek bioflavonoidů závisí na jejich struktuře, poloze hydroxylových skupin a dvojných vazeb heterocyklického jádra (Evans et al. 1996).

Ve studii německých vědců (Bors et al. 1997) byla stanovena tři základní kritéria, která se podílí na potenci molekuly flavonoidu zachytávat volné radikály: přítomnost dvou hydroxyskupin v 3. a 4. pozici na B kruhu; dvojná vazba mezi C2 a C3, substituce C3 a C5 OH-skupinami a dále oxo- funkční skupina na C4.

Jejich antioxidační vlastnosti jsou dále silně ovlivněny stupněm glykosylace např. aglykony kvercetin a myricetin vykazují *in vitro* daleko vyšší aktivitu než jejich glykosidy (Kaur & Kapoor 2001).

Bylo zjištěno, že struktura fenolových sloučenin vykazuje anti- a pro-oxidační schopnost (Leung et al. 2007). Několik nedávných studií prokázalo, že k protinádorové aktivitě dochází prostřednictvím pro-oxidačního účinku flavonoidů (Li et al. 2008, Habtemariam & Dagne 2010). Nádorové buňky v porovnání se zdravými buňkami vykazují při vyšší úrovni oxidačního stresu vyšší citlivost k toxickému účinku léků, které zvyšují hladinu ROS (reaktivní forma kyslíku), v porovnání se zdravými buňkami (Valdameri et al. 2011).

I přesto, že rostlinné fenolové sloučeniny mohou mít pro-oxidační účinek, jejich hlavní role spočívá zřejmě v antioxidačním působení, protože mají schopnost zhaset ROS, RNS (reaktivní

forma dusíku) a jiné volné radikály (Li et al. 2008, Habtemariam & Dagne 2010).

Jednou ze skupin fenolových sloučenin jsou fenolové kyseliny, které se rozlišují na dvě základní skupiny: na deriváty benzoové kyseliny a na deriváty kyseliny skořicové.

Hydroxybenzoové kyseliny jsou součástí struktury hydrolyzovatelných tanninů (gallotaninů v mangu a ellagitanninů v jahodách, malinách a ostružinách) (Manach et al. 2005). Hydroxyskořicové kyseliny jsou běžnější než hydroxybenzoové kyseliny. Nejvýznamnějšími z této skupiny jsou deriváty p-umarinové, kávové, ferulové a sinapové kyseliny (Gharras 2009). Hydroxyskořicovou kyselinu nalezneme v borůvkách, kiwi, švestkách, třešních a jablkách. Ester hydroxyskořicové kyseliny je chlorogenová kyselina, přítomná hlavně v kávových zrnech (Rawel & Kulling 2007). A má silnou antioxidační a antivirovou aktivitu. Slouží také jako prevence před poškozením jater (Farah & Donangelo 2006).

Nejrozšířenější fenolovou kyselinou je benzoová kyselina (Velíšek & Hajšlová 2009). Ve formě esterů je přítomna v rostlinných silicích, ale je k nalezení také v ovoci a zelenině. Je přítomna však i v jogurtech, kde vzniká hydrolyzou hippurové kyseliny za působení enzymů LAB během zrání (Barberán & Clifford 2000).

Fenolové kyseliny, a to hlavně skořicová, kávová, ferulová, 3-kumarová a chlorogenová, vykazují účinnost proti gramnegativním bakteriím a jiným mikrobům (Pimiä et al. 2005).

Do fenolových sloučenin se řadí také třísloviny, které mají relativně vysokou molekulovou hmotnost s mnoha fenolovými hydroxylovými skupinami ve své struktuře. Jedná se o polymery a společně s proteiny tvoří komplexy. Ve vodě tvoří třísloviny koloidní roztoky, avšak rozpustnost se mění dle stupně polymerace.

U vyšších rostlin se třísloviny rozdělují z chemického hlediska na dvě třídy, a to na hydrolyzovatelné třísloviny a kondenzované třísloviny (Bruneton 2016). Do skupiny hydrolyzovatelných tříslovin řadíme polymery esterů gallové kyseliny, polygalloyestery, z metabolismu šikimové kyseliny přímou dehydrogenací 3-dehydrošikimové kyseliny, případně oxidací proto-katechové a gallové kyseliny (3,4,5-trihydroxybenzoová (Bruneton 2016). Do kondenzovaných tříslovin patří polymery flavoniodních látek, tvořených zejména 3-hydroxyflavanem (Velíšek & Hajšlová 2009).

Nejpočetnější skupinu tvoří flavonoidy skládající se hlavně z katechinů, proantokyaninů, anthokyanidinů a flavonů, flavonolů a jejich glykosidů. Jedná se o sloučeniny C₁₅ složených ze dvou fenolových kruhů spojených třemi uhlíkovými jednotkami.

Flavonoidy jsou biosynteticky odvozeny od acetátu tak, že kruh A má charakteristický hyd-

roxylační vzorek v poloze 5 a 7. Kruh B je hydroxylovaný obvykle na 4, 3, 4 nebo 3, 4, 5. Obdobou flavonoidů jsou izoflavonoidy, které jsou odvozeny cyklizací chalkonů tak, že kruh B je umístěn v poloze 3.

Jiné hlavní skupiny flavonoidů zahrnují katalyzátory (často nalezené jako estery s kyselinou galovou v čaji) a anthokyanidiny, které jsou vysoce barevnými pigmenty (Aron & Kennedy 2008).

Flavan-3-oly, také známé jako flavanoly, jsou hlavními fenolovými sloučeninami přijímanými v potravě. Zde se nacházejí jako monomery i oligomerní proantokyanidiny. Mezi nejbohatší zdroje flavan-3-olů patří kakao, červené víno, zelený čaj, také se vyskytuje v bobulích a jablkách. Těmto fenolovým sloučeninám se dostává zvýšené pozornosti kvůli jejich přínosům pro zdraví, protože mohou působit jako antioxidanty. Působí v prevenci nádorových a kardiovaskulárních onemocnění, a také fungují jako antimikrobiální, antivirové a neuroprotektivní látky (Yao et al. 2004).

Zvláštní skupinou jsou prenylované flavonoidy, které se nacházejí zejména v chmelu. Na základní strukturu C15 je připojený prenylový radikál jako acyklický nebo cyklický řetězec (Takayama et al. 1991). Pro pivovarnictví mají význam zejména acylfluoroglucinoly, které jsou biosynteticky příbuzné prenylovaným flavonoidům, lupulony (β -kyseliny), humulony (α -kyseliny) (Stevens & Page 2004).

V posledních letech se staly tyto látky předmětem lékařského a farmaceutického výzkumu hlavně pro své bioaktivní účinky. Nejdůležitějším prenylovaným flavonoidem je xanthohumol, přítomný v samičích hlávkách chmelu, kde tvoří největší podíl ze zastoupených prenylovaných flavonoidů (Stevens & Page 2004), mezi ostatní patří isoxanthohumol, desmethylxanthohumol, a 8-prenylnaringenin. U těchto látek bylo prokázáno, že mají protizánětlivou, protinádorovou a antibakteriální aktivitu (Jirovetz et al. 2006).

Mezi významné fenolové sloučeniny patří stilbeny a jejich deriváty, které se využívají při prevenci a léčbě řady onemocnění (Baker et al. 2007). Tyto účinky má hlavně resveratrol patřící mezi důležité rostlinné metabolity a fungující jako silný antioxidant.

3.3.3 Resveratrol

Resveratrol (3, 4, 5-trans-trihydroxy-stilben nebo 5-[(E)-2-(4-hydroxyfenyl) ethyl] benzen-1, 3-diol) je přirozeně se vyskytující fytoalexin, který byl poprvé izolován z kořenů bílé čemeřice v roce 1940 (Langcake & Pryce 1976). Později se izoloval z kořenů *Polygonu cuspidatum*, který

se používá v tradiční čínské a japonské medicíně (Lee et al. 2012). Tato fenolová sloučenina je obsažená v rostlinách a to včetně révovitých (*Vitaceae*), dvojkrídláčovitých (*Dipterocarpaceae*), liánovcovitých (*Gnetaceae*), šáchorovitých (*Cyperaceae*) a bobovitých (*Leguminosae*) (Ito et al. 2004). Resveratrol je obsažený v potravinách v různých koncentracích, především však u červeného vína, brusinkového džusu a arašídů je jeho množství značné (Wang et al. 2002).

Resveratrol je charakterizován dvěma benzenovými kruhy spojenými přes isopropylovou část oddělenou dvojnou vazbou (Kasiotis et al. 2013). Existuje v podobě dvou stereoizomerů v *cis* a *trans* formě (*Z* a *E*), přičemž forma *E* vykazuje více potenciálu jako antioxidant a jako protinádorové činidlo (Roupe et al. 2006). S jeho antioxidační aktivitou je spojen také „francouzský paradox“. Tento paradox vznikl před téměř 20 lety, kdy i přes vysokou spotřebu tučných potravin byl u Francouzů zaznamenán nižší výskyt úmrtnosti v důsledku chronické srdeční choroby, což by mělo být způsobeno větší konzumací červeného vína, které obsahuje resveratrol (Lippi et al. 2010). Ten působí jako silný antioxidant, inhibuje reaktivní druhy kyslíku (ROS) především aktivací AMP-aktivované protein kinázy. Kromě toho také potlačuje cyklooxygenázu a peroxidaci lipidů (Szabó 2009). Zabraňuje peroxidaci lipoproteinů s nízkou hustotou (LDL), zabraňuje cytotoxicitě oxidovaného LDL a chrání buňky před peroxidací lipidů (Lee & Kader 2000).

Vysoká lipofilnost resveratrolu vede k nízké rozpustnosti ve vodě, což snižuje jeho perorální biologickou dostupnost spolu s jeho stabilitou (Das et al. 2008). Může však poskytnout účinnější ochranu než jiné známé antioxidanty, jako je vitamín C a E (Lee & Kader 2000).

Kromě antioxidačních a protinádorových účinků byly navíc zjištěny i další terapeutické účinky resveratrolu, jako že je neuroprotektivní, antidiabetický a působí i antivirově (Lippi et al. 2010). Kardioprotektivní účinky resveratrolu mohou být způsobeny jeho vazorelaxačními vlastnostmi. Vazorelaxantní aktivitu má resveratrol kvůli schopnosti stimulovat kanály aktivované Ca^{2+} a zvyšovat signalizaci NO v endotelu (Lee & Kader 2000).

Bylo zjištěno, že podávání diphenol resveratrolu mělo zřetelný anti-metastatický účinek, čímž se snížil počet i hmotnost metastáz plic. Podobné účinky byly pozorované u resveratrolu, což vedlo k přibližně 40% snížení počtu metastáz (Busquets et al. 2007).

Ve studii Kimura & Okuda (2001) zabývající se resveratrolelem bylo zjištěno, že na myších modelech resveratrol v dávkách 2,25 a 10 mg/kg významně snižuje objem nádoru (42 %), hmotnost nádoru (44 %) a metastáze plic (56 %). Bylo také zaznamenáno, že inhibiční účinek

resveratrolu na karcinogenezi je ve více stádiích, zejména na kůži (Jang et al. 1997).

V několika studiích (Walle et al. 2004, Larrosa et al. 2009, Bhat et al. 2004) bylo zjištěno, že resveratrol zvyšuje účinnost některých antiretrovirových léků proti HIV a viru herpes simplex, protože reguluje expresi NF κ B, a tak potlačuje aktivaci tohoto proteinu souvisejícího s transkripcí a apoptózou.

Zjistilo se také, že mnoho virových proteinových produktů bylo sníženo nebo zcela blokováno, stejně jako snížení produkce virové DNA například při léčbě viru chřipky tím, že omezuje jeho replikační vlastnosti. V jiné studii byla replikace těžkého akutního respiračního syndromu zcela inhibována deriváty resveratrolu *in vitro* (Li et al. 2006).

Mimo to byla provedena studie (Qiao et al. 2014), která spojuje resveratrol se změnou složení střevního mikrobiomu. Tato studie zkoumala účinek resveratrolu proti obezitě a zjistila, že užitím 200 mg/kg/den resveratrolu se významně snižuje tělesná i viscerální tuková hmotnost. Zároveň se snižuje hladina glukózy v krvi a i hladina lipidů. Dále bylo zjištěno, že také resveratrol zlepšuje dysbiózu mikrobiální tkáně indukovanou vysokotukovou dietou, včetně zvýšení poměru *Bacteroidetes* k *Firmicutes* dochází k významné inhibici růstu *Enterococcus faecalis* a zvýšení růstu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Resveratrol významně snižuje expresi mRNA Lpl, Scd1, Ppar-y, Acc1 a Fas související se syntézou mastných kyselin, adipogenezí a lipogenezí. Proto resveratrol zprostředkovává složení střevních mikrobů a postupně prostřednictvím signální dráhy Fiaf urychluje vývoj obezity. Signální dráhy, též signální kaskády jsou sekvence událostí, které umožňují buňce přijmout signál a biologicky na něj reagovat.

Resveratrol ovlivňuje i diabetes melitus, což může být způsobeno významným vlivem resveratrolu na hladinu glukózy v plazmě, jak bylo prokázáno na zvířecích modelech zdravých tak u diabetických potkanek, diabetes indukovaný streptozotocinem a nikotinamidem streptozotocinem. Bylo zjištěno, že resveratrol má hypoglykemický účinek a také bylo zjištěno, že v obou případech, i u zdravého i u diabetického potkana, byla hladina inzulinu po resveratrolu zvýšena (Sharma et al. 2007, Atkinson et al. 2014).

Dále resveratrol snižuje hladinu malondialdehydu, xantinoxidasy a oxidu dusnatého v hipokampu, mozku a míše, přičemž současně došlo k nárůstu glutathionu v porovnání se skupinou léčenou na diabetes (Carter et al. 2010). Dokazuje to, že resveratrol je silným neuroprotektivním činidlem proti diabetickému oxidativnímu poškození. Díky těmto účinkům je resveratrol doporučován při léčbě diabetické neuropatie (Sharma et al. 2007).

Kapitola 4

Materiál a metody

4.1 Materiál

Bakteriální kmeny byly získané z České sbírky mikroorganismů: *L. plantarum* (MILCOM 195; neznámé) a *L. fermentum* (CCM 91; neznámé). Buněčné linie lidského střevního epitelu buněčné linie Caco-2 a HT29-MTX byly získány z American Type Tissue Collection (Rockville, Maryland, USA). Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM), penicilin a streptomycin, hydrogenuhličitan sodný, pyruvát sodný, neesenciální aminokyseliny, fetální bovinní sérum (FBS), fosfátový pufr (PBS), trypsin, triton X-100, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid (MTT), dimethylsulfoxid (DMSO), resveratrol 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). Rogosa agar (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK).

4.2 Metody

4.2.1 Příprava bakteriální suspenze

Bakterie byly pěstovány přes noc v Wilkins-Chalgren agaru (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) při 37 °C za anaerobních podmínek. Před stanovením byly bakterie centrifugovány (2 000 × g 10 minut) a promyty třikrát pomocí PBS. Bakterie potom byly resuspendovány v 5 ml PBS při koncentraci 10⁸ CFU/ml, která byla stanovena z jejich optické hustoty při vlnové délce 600 nm na TECAN M200 Infinite reader (Tecan Austria GmbH, Grödig, Rakousko).

4.2.2 Příprava resveratrolu

Byl připraven zásobní roztok o koncentraci 10 mg/ml v DMSO. Před vlastními testy byly připraveny pracovní roztoky resveratrolu v DMEM bez přídavku v koncentracích 4,5; 2,25 a 1,125 ug/ml a na buňky byly aplikovány alikvotní podíly.

4.2.3 Kultivace buněčných linií

Buňky kolorektálního karcinomu zastoupené liniemi Caco-2 a HT29-MTX byly kultivovány v mediu DMEM, které obsahovalo 10 % FBS, 1 % roztoku penicilinu a streptomycinu (100 000 jednotek penicilinu; 10 mg/ml streptomycinu), 1 % hydrogenuhličitanu sodného, 1 % pyruvátu sodného a 1 % roztoku neesenciálních aminokyselin. Buňky byly pěstovány v kultivačních láhvích (75 cm²) s 15 ml DMEM media, poté byly uloženy v inkubátoru s řízenou atmosférou obsahující 5 % CO₂ a v teplotě 37 °C. Medium bylo měněno každé dva dny. Buňky byly sklizeny 7. den pomocí trypsinu a odstředěny na centrifuze po dobu 10 minut, při 170×g. Bylo odstraněno staré medium a buňky byly naředěny v novém mediu. Z takto nachystané suspenze bylo odebráno 0,5 ml media s buňkami a opět přidány k 15 ml nového DMEM media v kultivační láhvi pro další kultivaci.

4.2.4 Založení 24 a 96 jamkové destičky

Z buněčné suspenze, která byla důkladně rozpuštěna, bylo odebráno 100 µl suspenze a smícháno se 100 µl tripanové modře. Následně byla odebrána kapka a byla dána na Bürkerovu komůrku. V 1 ml suspenze byl spočítán obsah buněk. Dle výpočtu byla zjištěna přesná koncentrace sklizených buněk. Do směsi bylo přidáno $3,6 \times 10^4$ Caco-2 a $0,4 \times 10^4$ HT29-MTX. Tato směs byla pipetována na jamku v objemu 500 µl u 24 jamkové destičky a takto připravená destička byla uložena v kultivačním boxu. Po dobu 14 dní probíhalo každé 2–3 dny krmení těchto buněk. Po 14 dnech by měla proběhnout plná diferenciací buněk a také by mělo dojít k plné konflucenci monovrstvy.

U 96 jamkové destičky bylo pipetováno 200 µl a destička inkubována 24 hodin.

4.2.5 Test životaschopnosti

Test životaschopnosti byl měřen pomocí metody MTT dle Mosman (1983), která byla modifikována. Buňky byly naředěny na koncentraci 4×10^4 buněk/ml a pipetovány do 96 jamkové

destičky v množství 200 μl . Po 24 hodinách bylo odstraněno staré medium a přidáno 100 μl nového media spolu s testovanými vzorky v daných koncentracích (0,125–256 $\mu\text{l/ml}$). Testované vzorky s buňkami byly inkubovány po dobu 72 hodin. Po této době bylo medium nahrazeno 100 μl nového media s MTT (1 $\mu\text{g/ml}$). Po 2 hodinách v CO_2 inkubátoru bylo medium s MTT opět odstraněno a nahrazeno 100 μl DMSO. Absorbance byla měřena při 555 nm a 720 nm, jako referenční hodnoty, za použití TECAN M200 Infinite reader. Procento životaschopných buněk bylo vypočteno, v porovnání s kontrolou, kde byly buňky bez přidání testovaných látek.

4.2.6 Adhezní testy

Pro zjištění adhezních vlastností byla použita modifikovaná metodika (Jensen et al. 2012). Z každé jamky na destičce bylo odstraněno staré medium a každá jamka byla propláchnuta 3 \times pomocí PBS. Poté bylo přidáno 900 μl DMEM media s resveratrolem v koncentraci 4,5; 2,25 a 1,125 $\mu\text{g/ml}$ a bez. Následně bylo přidáno 100 μl bakteriální suspenze.

Destička byla inkubována v anaerobním boxu při 37 $^\circ\text{C}$ po dobu 2 hodin. Po dvou hodinách bylo odstraněno medium s bifidobakteriemi. Monovrstvy buněk byly 3 \times promyty pomocí PBS pro odstranění neadherovaných bakterií. Do prázdných jamek bylo přidáno 300 μl 1% Triton-X100 na 1 minutu a zředěno 700 μl PBS. Suspenze z buněk a adherovaných bakterií byla naředěna. Následně byla suspenze dána na petriho misku společně s Rogosa agarem. Jednotky tvořící kolonie (CFU) byly po 72 hodinách aerobní inkubace při 37 $^\circ\text{C}$. Poté byly bakterie spočítány dle vzorce 4.1 (kontrola reprezentuje 100% adheenci).

$$\text{Adherence} = \frac{\text{počet bakterií ve vzorku}}{\text{počet bakterií v kontrole}} \times 100 \quad (4.1)$$

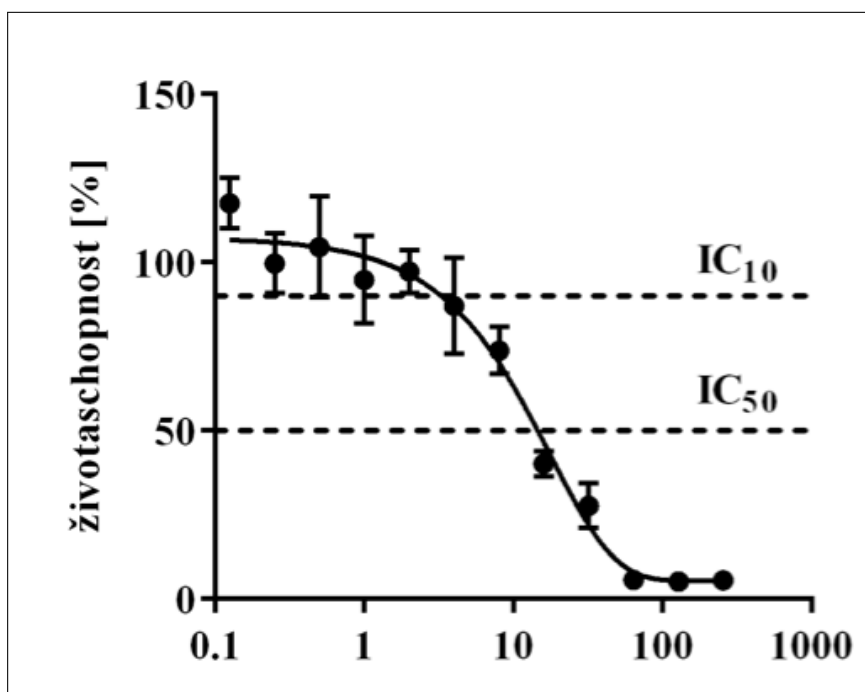
4.2.7 Statistická analýza

Získané výsledky MTT testu jsou vyjádřeny jako průměr \pm směrodatná odchylka. Výsledky adheze byly analyzovány pomocí dvoucestné analýzy rozptylu (ANOVA, $p < 0,05$) byla použita pomocí programu Statistica 12 k vyhodnocení statistického vlivu resveratrolu na adhezi bakterií. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm standardní chyba a porovnání posteriori bylo analyzováno Scheffeovým testem.

Kapitola 5

Výsledky

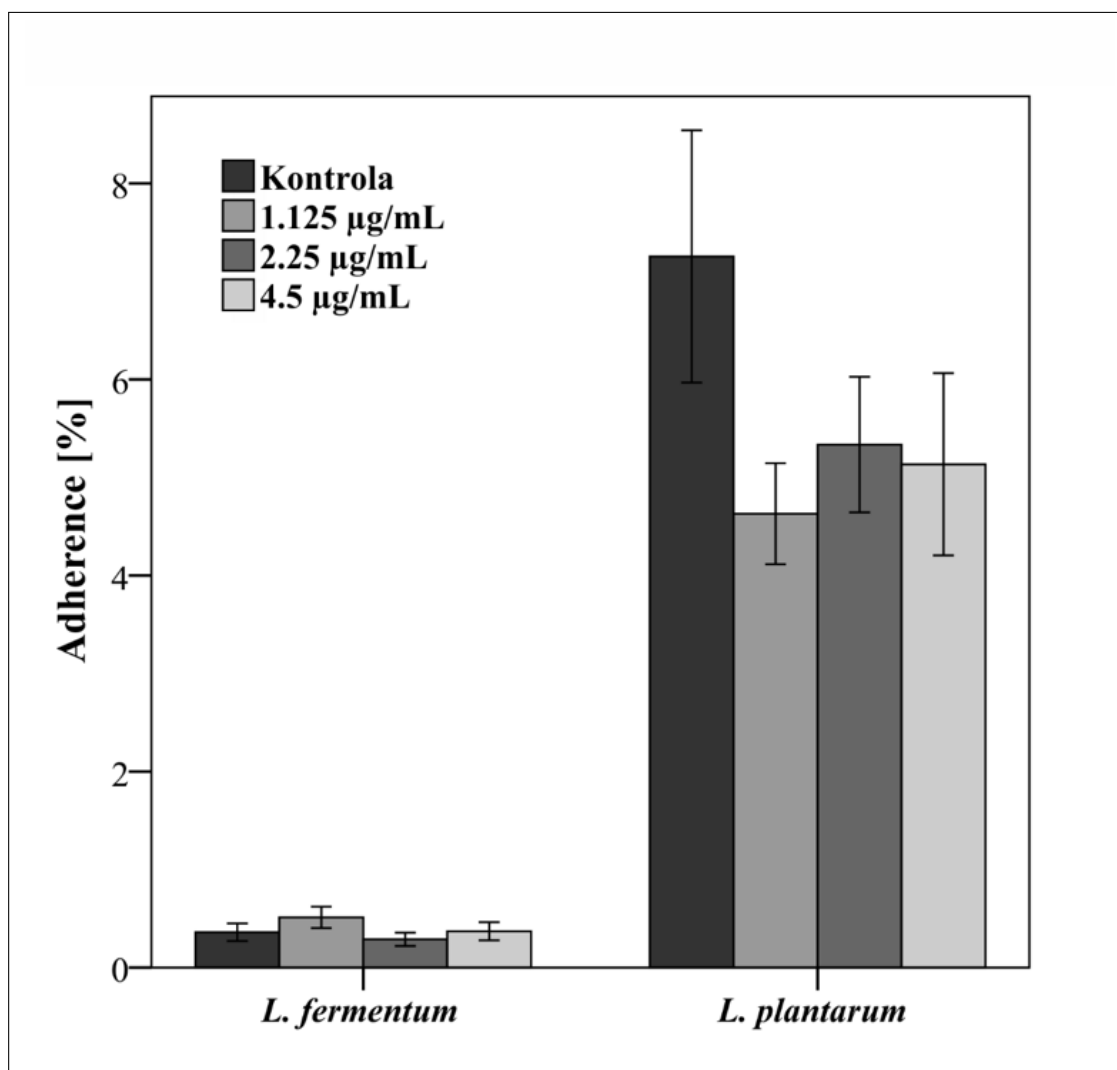
Jako první byl proveden test životaschopnosti pomocí MTT aby byla stanovená bezpečná koncentrace použitelná pro testování adherence. Zjištěná výsledná hodnota resveratrolu pro IC_{50} je $13,60 \pm 0,16$. Z výsledků je patrné, že resveratrol nemá cytotoxické účinky. Avšak výsledek je pro další testování nevhodný zdůvodů poškození monovrstvy. Z tohoto důvodu byly vypočteny hodnoty IC_{10} (Obr. 5.1) $3,56 \pm 0,36 \mu\text{g/ml}$. A následně používané koncentrace se pohybuje okolo této hodnoty.



Obrázek 5.1: Test životaschopnosti na směsné buněčné kultuře Caco-2/HT29-MTX po přidání resveratrolu v koncentraci 0,125–256 $\mu\text{g/ml}$; hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm směrodatná odchylka

Po stanovení bezpečné koncentrace resveratrolu pro buněčnou monovrstvu tvořenou buněčnými liniemi Caco-2/HT29-MTX, byl proveden test adhezních vlastností *L. fermentum* a *L. plantarum* (Obr. 5.2). Z grafu je patné, že *L. fermentum* adheroval minimálně ve všech testovaných koncentracích. Na rozdíl od *L. plantarum*, který adherovalo více, avšak resveratrol měl negativní vliv na adhezní vlastnosti tohoto kmene, kdy se adheze snižovala o 1–2 % oproti kontrole bez resveratrolu.

Výsledky však nejsou statisticky průkazné na hladině významnosti $p < 0,05$. To bylo dáno i vysokou variabilitou výsledků mezi jednotlivými měřeními, které jsou způsobeny nejčastěji vlastnostmi buněčné monovrstvy a její schopností na sebe poutat námi testované kmeny.



Obrázek 5.2: Adherence bakterií *Lactobacillus fermentum* a *Lactobacillus plantarum* po přidání resveratrolu v koncentraci 4,5; 2,25 a 1,125 µg/ml; výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm standardní chyba

Kapitola 6

Diskuze

V současné době velká část populace trpí onemocněním, jako jsou alergie, urogenitální infekce, gastrointestinální infekce, syndrom dráždivého tračníku, průjemová onemocnění, případně zácpy. Při těchto onemocněních mohou sloužit jako prevence 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* (DeVrese & 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 (mléčná, octová a máselná kyselina), 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 (DeVrese & Marteau 2007).

Střevní mikrobiom je schopný reagovat s fenolovými sloučeninami, které hrají klíčovou roli jak v antioxidační aktivitě, tak při působení na střevní mikrobiom, a podílejí se na lidském

zdraví (Crozier et al. 2009). Tyto fenolové sloučeniny mohou být ve střevu metabolizovány prostřednictvím mikrobiomu na bioaktivní sloučeniny a to hlavně přeměnou glykosidu na aglykon, který je schopný prostupovat střevním epitelem (Bowey et al. 2003). Současně s tím dochází k ovlivnění mikrobiomu prostřednictvím fenolových sloučenin (Selma et al. 2009).

Schopnost bakterií adherovat ke střevním epiteliálním buňkám je jedním z hlavních kritérií pro výběr nových probiotických kmenů spolu s dalšími vlastnostmi, jako je přežití v simulovaných gastrointestinálních modelech nebo produkce antimikrobiálních látek (Söderling et al. 1987). Vzhledem k obtížnosti stanovení adherence bakterií pomocí *in vivo* metod byla tato vlastnost studována pomocí *in vitro* metod využívajících lidské intestinální buněčné linie, pomocí kterých se vytvářejí 2D buněčné modely (Tuomola et al. 2000). Tyto *in vitro* modely se postupem času staly zavedenou a široce používanou metodou pro testování adhezních vlastností probiotických kmenů (Laparra & Sanz 2009, Volštátová et al. 2015, 2017, Musilová et al. 2017), pro testování toxicity rostlinných extraktů obsahujících fenolové sloučeniny, i pro testování čistých rostlinných látek (Doskočil et al. 2015, 2016, Tauchen et al. 2015, 2016, Vaněčková et al. 2016).

Nejčastěji jsou využívané buněčné linie pocházejí z tlustého střeva, zahrnující Caco-2, HT29, respektive HT29-MTX a mnoho dalších. Směsná kultura Caco-2/HT29-MTX poskytuje pokročilý *in cellulo* model, napodobující skutečný poměr Gobletových buněk k absorpci epiteliálních buněk (Laparra & Sanz 2009, Volštátová et al. 2015, 2017, Musilová et al. 2017) a produkující mucin. Tento glykoprotein vede k prostorově bohaté síti vazebných míst a substrátových skupin pro komensální mikrobiocyty (Carrier et al. 2006), které přispívají k adhezi mikrobiomu na střevní epitel.

V naší práci jsme využili stejný model jako řada autorů (Laparra & Sanz 2009, Volštátová et al. 2015, 2017, Musilová et al. 2017) a byla zjišťována adhezní schopnost *L. fermentum* a *L. plantarum* po přidání resveratrolu. Bylo zjištěno, že resveratrol statisticky nezvyšoval adhezní vlastnosti testovaných kmenů, a to ani u *L. fermentum*, kde velmi špatně adheroval samostatný kmen bez testované látky.

Dříve provedená studie Wang et al. (2008) testovala *L. gasseri* na jeho adhezivní vlastnosti, bylo zjištěno, že procento adheze je $12,05 \pm 1,34 \%$. To je v rozporu s našimi výsledky, možnou příčinou však je použití pouze buněčné linie HT29. Na buněčném modelu tvořeném Caco-2 adheze *L. gasseri* byla 4 % (Jensen et al. 2012), což je o dvě procenta více než na našem buněčném modelu tvořeném Caco-2 a HT29-MTX buněčnými liniemi. Takto nízká adheze může být za-

příčiněna faktorem, že buněčné linie HT29-MTX produkují muciny typu MUC5AC a MUC5B ve větší koncentraci než MUC2 (Leteurtre et al. 2012), to pravděpodobně vede k významnému nedostatku tohoto modelu, protože v tračníku převládají MUC2 (Lesuffleur et al. 1993) a tím dochází ke zkreslení výsledků provedených testů.

Z přidaného *L. plantarum* adherovalo 9 %, zatímco na samostatném modelu tvořeném pouze Caco-2 buňkami adherovalo od 10 do 15 % (García-Cayuela et al. 2014), což je téměř o polovinu více než v našem případě. V indické studii (Kumar et al. 2011) se uvádí, že *L. plantarum* na buňkách HT29 adhuje z 60 %, kdy se jedná téměř o 10× vyšší adhezi než v naší studii.

Adheze probiotických kmenů může být významně ovlivněna přítomností fenolových sloučenin ve stravě. Nedávné studie Bustos et al. (2012), Cueva et al. (2013) naznačují, že příznivé účinky fenolových sloučenin na zdraví mohou být zapříčiněny interakcí se střevním mikrobiomem. Je dokázáno, že některé fenolové sloučeniny a jejich metabolity mohou stimulovat růst, proliferaci a adhezní kompenzaci bakterií a inhibovat růst a adhezi střevních patogenů (Laparra & Sanz 2009, Parkar et al. 2008). Studie Bustos et al. (2012) uvádí, že účinek fenolových sloučenin je nekonzistentní, což naznačuje vysokou specifitu. Většina z nich nevykazuje žádný účinek, ale některé zřejmě stimulují adhezi vybraných kmenů na určité typy buněčných linií. Například epigallocatechin zvýšil adhezi *L. casei* k buňkám Caco-2, zatímco prokyanidiny B1 a B2 zvýšily adhezi k buňkám HT-29. Bylo prokázáno, že adheze *L. acidophilus* k buňkám Caco-2 je zvýšena epigallocatechinovým galátem. Z toho vyplývá, že účinek fenolových sloučenin na adhezi bakterií závisí na kmeni *Lactobacillus* a buněčné linii. Chybějící aktivita resveratrolu, která je patrná z naší studie, by mohla platit pro použité kmeny, a proto nelze vyloučit vliv na jiné kmeny, které nejsou zahrnuty do našeho panelu.

Studie Celebioglu et al. (2017) zkoumala účinek některých běžných fenolových sloučenin, včetně resveratrolu, na adhezivní vlastnosti *L. acidophilus* na buňky mucinu a HT-29. Ve svém modelu resveratrol významně zvýšil adhezi *L. acidophilus* jak pro mucin, tak pro buňky HT-29 při koncentraci 100 µg/ml a bylo prokázáno, že je jedním z nejúčinnějších testů u všech testovaných polyfenolů v důsledku možných změn exprese povrchových proteinů. Nicméně zůstávají obavy ohledně fyziologického významu použitých koncentrací. Mechanismy, kterými fenolové sloučeniny ovlivňují adhezi bakterií, nejsou stále plně prozkoumány.

Fenolové sloučeniny jsou schopny interagovat s mikrobiálními membránovými bílkoviny, enzymy a lipidy, čímž mění buněčnou propustnost a umožňují tak ztrátu protonů, iontů a

makromolekul. Existují také důkazy o tom, že fenolové sloučeniny by mohly ovlivňovat tvorbu biofilmu, jehož prvním krokem je adheze bakterií (Huber et al. 2003). Tyto bioaktivní molekuly by mohly mít vliv na adhezi patogenů k hostitelským tkáním, neboť adheze je nezbytnou podmínkou pro iniciaci většiny infekčních onemocnění. Bylo prokázáno, že rostlinné fenolové sloučeniny inhibují glukosyltransferasy, které zprostředkovávají přilnavost *Streptococcus mutans* a dalších perorálních bakteriálních druhů na povrch zubů, což přispívá k tvorbě biofilmů zubních plaků. Navíc fenolové sloučeniny mohou také inhibovat adhezenci bakterií tím, že snižují hydrofobnost mutantních streptokoků. Například brusinkové šťávy snížily adhezivní sílu v bakteriích *P. fimbriated* prostřednictvím změny povrchových makromolekul (Matsumoto et al. 2003). Fenolové sloučeniny z džusu jsou také schopné inhibovat vazbu *N. meningitidis pili* na imobilizované lidské epitelální buňky a výtažky z jablka bohaté na fenolové sloučeniny vykazují *in vitro* inhibiční účinek proti *Helicobacter pylori* (Pastene et al. 2010). V nedávné době bylo zjištěno, že resveratrol a některé deriváty inhibují adhezi *E. coli*, *Salmonella typhimurium* a *Listeria monocytogenes* k buněčným liniím epitelu střev a poté následuje produkce cytokinů jako reakce na přilnavost potravinového patogenu (Selma et al. 2012).

Adheze ke střevní sliznici je považována za rozhodující pro kolonizaci ve střevě a má se za to, že stimuluje hostitelský imunitní systém a to souvisí s určitými prospěšnými účinky probiotik (Sugimura et al. 2011). Existuje dynamický vztah mezi gastrointestinálním mikrobiomem a látkou, příjmem a metabolismem bioaktivních potravinových složek, jako jsou fenolové sloučeniny a střevní slizniční buňky. Jak čísla, tak i typy mikrobů a stravovací návyky mohou ovlivnit zdravotní stav hostitele. Ve studii Bustos et al. (2012) bylo prokázáno, že několik běžných flavan-3-olů má potenciál měnit střevní mikrobiom modifikací adheze probiotických kmenů *Lactobacillus* na střevní buňky. Takže konzumace stravy bohaté na tyto bioaktivní molekuly by mohla ovlivnit střevní mikrobiom a zvýšit celkovou pohodu člověka.

Resveratrol, který je potenciálním kandidátem s různými farmakologickými aktivitami, byl rozsáhle studován na základě farmakokinetických parametrů na různých zvířecích modelech a lidských dobrovolnících. Všechny farmakokinetické parametry, absorpce, distribuce, metabolismus a vylučování resveratrolu jsou dobře známy. I když bylo zjištěno, že lék má vysokou perorální absorpci (~75 %), perorální biologická dostupnost je téměř zanedbatelná (<1 %) kvůli rychlému a rozsáhlému metabolismu na metabolity síranu a glukuronidu v intestinu a játrech (Lee et al. 2012). U zdravých dobrovolníků byla provedena studie Wang et al. (2002), při které byly podávány různé koncentrace resveratrolu po dobu 29 dní (dávka 0,5; 1,0; 2,25

nebo 4,5 g/den) a bylo zjištěno, že podávání dávky 2,25 a 4,5 g způsobuje mírné až středně závažné gastrointestinální potíže. Podobný typ studie u zdravých dobrovolníků provedl Lippi et al. (2008) k určení farmakokinetického a bezpečnostního profilu resveratrolu. Celkem 40 zdravých dobrovolníků bylo rozděleno do čtyř skupin (5 mužů a 5 žen v každé skupině). Dvěma jedincům bylo podáváno placebo a zbývajícím 8 bylo podáváno 25, 50, 100 a 150 mg resveratrolu šestkrát denně po dobu 13 dní. Byly zjištěny různé farmakokinetické parametry, kde vrchol plazmatické koncentrace nastal mezi 45 a 90 minutou. Průměrná C_{max} a průměrná AUC_{0-t} závisí na dávce, což se zvýšilo s nárůstem dávky z 25 na 150 mg (Lippi et al. 2008). Další studie Lee et al. (2012) proběhla u 10 zdravých dobrovolníků s podáním různých dávek léku v rozmezí od 0,5 do 4,5 g p. o., jednorázová dávka a podobná metoda byla použita pro stanovení koncentrace léčiva a metabolitu v plazmě a moči. Výsledky ukázaly, že vrcholové plazmatické hladiny 539 ± 384 ng/ml se objevily 1,5 hodiny po podání léku. Vylučování léku a jeho metabolitů močí bylo rychlé, to znamená 4 hodiny po nejnižší dávce. Otázka zněla, jak je vlastně resveratrol dostupný z běžně konzumovaných potravin a zda se dostává do tlustého střeva v nezměněné formě. Dostupnost je možné zvýšit mikroenkapsulací resveratrolu, která zvyšuje rozpustnost ve vodném prostředí, čímž zlepšuje biologickou dostupnost a také zabraňuje degradaci vlivem světla a tepla (Szabó 2009). Das et al. (2008) zjistili, že získaná formulace zlepšuje stabilitu resveratrolu pro specifické dodávání do tlustého střeva s účinností zapouzdření >94 %.

V modelových systémech bylo prokázáno, že resveratrol má chemopreventivní aktivitu proti kardiovaskulárním onemocněním a různým typům rakoviny v modelových systémech, není však zřejmé zda léčivo po perorálním podání dosáhne navržených míst účinku *in vivo* zejména u lidí. Jedna ze studií Walle et al. (2004) se zabývala absorpcí, biologickou dostupností a metabolismu ¹⁴C-resveratrolu po orálním podání dávky u šesti dobrovolníků. Absorpce 25 mg perorální dávky byla nejméně 70 %, maximální plazmatické hladiny resveratrolu a metabolitů dosáhly 491 ± 90 ng/ml (přibližně 2 μ M) a plazmatický poločas byl $9,2 \pm 0,6$ hodiny. V plazmě bylo možné detekovat pouze stopové množství nezměněného resveratrolu (<5 ng/ml). Většina perorální dávky byla získána z moči a analýza kapalinovou chromatografií/hmotnostní spektrometrií identifikovala tři metabolické dráhy. Extrémně rychlá konjugace sulfátů ve střevech a játrech omezuje rychlost biologické dostupnosti resveratrolu. Ačkoli systémová biologická dostupnost resveratrolu je velmi nízká, díky akumulaci resveratrolu v epitelálních buňkách podél aerodigestivního traktu a potenciálně aktivních metabolitů resveratrolu mohou stále působit jako prevence rakoviny.

Většina studií zabývajících se účinky *in vivo* testuje obrovské dávky resveratrolu, které nejsou reprezentativní z hlediska stravování. Cílem studie Larrosa et al. (2009) bylo zjistit, zda resveratrol může vykazovat protizánětlivou aktivitu *in vivo* z množství přijaté ze stravy. Potkani byli krmeni 1 mg resveratrolu/kg/den (lidská ekvivalentní dávka) po dobu 25 dnů a během posledních 5 dnů bylo podáno 5% dextran sulfátu sodného (DSS) k vyvolání kolitidy. Byly hodnoceny účinky na poškození tlustého střeva, střevní mikroflóru, reaktivní druhy kyslíku, zánětlivé markery a tvorba oxidu dusnatého, stejně jako profil genové exprese. Resveratrol zvýšil laktobacily a bifidobakterie stejně jako snížil nárůst enterobakterií při léčbě. Resveratrol významně chránil sliznice tlustého střeva, snížil ztrátu tělesné hmotnosti, snížil indukovanou anemii a snížil systémové markery zánětu, prostaglandin E2, cyklooxygenázu-2, prostaglandin E a také syntázu a hladinu oxidu dusnatého. Kromě toho byla změněna exprese 2 655 genů v distální sliznici tlustého střeva související s důležitými metabolickými cestami. Tyto výsledky posilují koncept resveratrolu jako dietní příznivé sloučeniny ve střevním zánětu při dávkách, které je možné dosáhnout u nutraceutických přípravků obohacených o resveratrol. *In vitro* studie naznačují, že monomery flavan-3-olu, jako je epikatechin a katechin jsou schopny ovlivnit populaci bakterií v tlustém střevě dokonce i za přítomnosti jiných živin, jako jsou sacharidy a bílkoviny. Katechin výrazně inhiboval růst *Clostridium histolyticum* a zvýšil růst *E. coli* a členy skupiny Rectale *Clostridium coccooides* — *Eubacterium*, zatímco růst *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* spp. zůstaly relativně nedotčeny (Tzounis et al. 2008).

Ve studii Dolara et al. (2005) dietní podávání výtažků bohatých na proanthokyanidin měl také podobný účinek. Kompozice fekálních bakterií potkanů, jejichž dieta byla doplněna po dobu 16 týdnů extraktem z červeného vína bohatým na proantokyanidin, se přesunula z převahy *Bacteroides*, *Clostridium* a *Propionibacterium* spp. na převahu *Bacteroides*, *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* spp. U lidí extrakt bohatý na proanthocyanidin z hroznových semen podávaný zdravým osobám po dobu 2 týdnů byl schopen významně zvýšit počet bifidobakterií (Yamakoshi et al. 2001). Nicméně nedávné studie Viveros et al. (2011) naznačuje, že monomerní flavan-3-oly a zdroje bohaté na flavan-3-ol, jako jsou čokoláda, zelené čaje nebo extrakty z hroznových semen, mohou modulovat střevní mikrobiom a způsobovat změny v prospěšných bakteriích, jako je *Lactobacillus* spp. ale také inhibovat jiné skupiny, jako je *Clostridium* spp. Nedávno kakaová dietní intervence u potkaních modelů ukázala významný pokles podílu rodů *Bacteroides*, *Clostridium* a *Staphylococcus* ve stolici zvířat krmených kakaem (Cladera et al. 2012). Jiné studie u potkanů prováděné Smith et al. (2005) zjistili, že když byla potkanům po-

dávána strava bohatá na taniny, skupina *Bacteroides* se významně zvýšila, zatímco *Clostridium leptum cluster* se významně snížil. Podobně se se choval i resveratrol který ovlivnil počty *Bifidobacterium* spp. a *Lactobacillus* u potkaních modelů (Larrosa et al. 2009).

Lidská intervenční studie Vendrame et al. (2011) ukázala, že konzumace fenolových sloučenin z červeného vína významně zvýšila počet *Enterococcus*, *Prevotella*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides uniformis*, *Eggerthella lenta* a *Blautia coccoides-E.* rektální skupina, zatímco množství *Lactobacillus* spp. byl nezměněn. Na druhé straně, když byly bakterie kultivovány různými čajovými fenolickými látkami, růst patogenních bakterií, jako jsou *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile* a *Bacteroides* spp., byl významně potlačen, zatímco kompenzační anaeroby jako *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* byly méně postiženy. Došlo také k významnému nárůstu množství *Bifidobacterium* po konzumaci divokého borůvkového nápoje, což naznačuje důležitou roli polyfenolu přítomného u divokých borůvek na modulaci kompozice střevní mikroflóry.

Vedle bakteriálních vztahů mezi hostitelem a bakteriemi má potrava velmi silný vliv při vytváření vyváženého střevního mikrobiomu. Proto je důležité zvážit, zda příjem různých potravin a jejich složek může ovlivnit kolonizaci střeva. V *in vitro* studii bylo prokázáno, že fenolové frakce z bobulové šťávy inhibují adhezi *Neisseria meningitidis* k lidským epiteliálním buňkám (Toivanen et al. 2011).

Kapitola 7

Závěr

Biologická dostupnost a účinky fenolových sloučenin velmi závisí na jejich transformaci složkami střevní mikroflóry. Byly provedeny různé studie s cílem porozumět transformaci střevních mikrofilmů u konkrétních typů fenolových sloučenin a identifikovat odpovědné mikroorganismy. Naše výsledky, při kterých bylo využito *L. plantarum* a *L. gasseri* společně s resveratolem neprokázal žádný pozitivní efekt toho stilbenu na adhezivní vlastnosti těchto probiotik.

To může být zapříčiněno, modelem, obsahujícím buněčnou linii HT29-MTX, která produkuje omezené množství MUC2 a tím se negativně ovlivňuje schopnost adheze. Další možností, je špatná biologická dostupnost resveratrolu bakteriemi, kdy je možnost, že dimethylsulfoxid nebyl správně zvoleným rozpouštědlem a je otázka, zda negativně neovlivňuje adhezivní vlastnosti.

Také je otázka, jaký vliv má forma čistého resveratrolu, který neprošel mikrobiální fermentací, která by mohla zvýšit jeho biodostupnost pro bakterie a buněčný model a tím zvýšit adhezivní vlastnosti testovaných probiotických kmenů.

To nás vede k mnoha dalším otázkám biologické aktivity resveratrolu na střevní mikrobiom, které nejsou doposud dostatečně prostudované a publikované v odborné literatuře. Ani naše výsledky neposkytly odpovědi a vliv resveratrolu na probiotika si zaslouží další hlubší studování, za použití jiných buněčných modelů, rozpouštědel a zejména simulaci trávení a průchodu gastrointestinálním traktem, kdy je pravděpodobné, že se změní biodostupnost resveratrolu.

Literatura

- Aron, P. & Kennedy, J. (2008), 'Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity.', *Molecular Nutrition Food Research* **52**(1), 79–104.
URL: <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700137>
- Atkinson, M., Eisenbarth, G. & Michels, A. (2014), 'Type 1 diabetes', *The Lancet* **383**(9911), 69–82.
URL: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60591-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60591-7)
- Baker, D., Chu, M., Oza, U. & Rajgarhia, V. (2007), 'The value of natural products to future pharmaceutical discovery', *Natural Product Reports* **6**(24), 1225–1244.
URL: <http://dx.doi.org/10.1039/B602241N>
- Balasundram, N., Sundram, K. & Samman, S. (2006), 'Phenolic compounds in plants and agricultural by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses', *Food Chemistry* **99**(1), 191–203.
URL: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>
- Barberán, F. & Clifford, M. (2000), 'Flavanones, chalcones and dihydrochalcones—nature, occurrence and dietary burden.', *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**(7), 1073–1080.
URL: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<1073::AID-JSFA568>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1073::AID-JSFA568>3.0.CO;2-B)
- Berry, D. (2016), 'The emerging view of firmicutes as key fibre degraders in the human gut', *Environmental Microbiology* **18**(7), 2081–2083.
URL: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13225>
- Bhat, K., Kosmederll, J. & Pezzuto, J. (2004), 'Biological effects of resveratrol', *Antioxidants*

& *Redox Signaling* **3**(6), 1041–1064.

URL: <http://doi.org/10.1089/152308601317203567>

Bors, W., Michel, C. & Stettmaier, K. (1997), 'Antioxidant effects of flavonoids', *BioFactors* **6**(4), 399–402.

URL: <https://doi.org/10.1002/biof.5520060405>

Boto-Ordóñez, M., Urpi-Sarda, M., Monagas, M., Tulipani, S., Llorach, R., Rabassa-Bonet, M., Garcia-Aloy, M., Queipo-Ortuno, M., Estruch, R., Tinahones, F., B.Bartolome & Andres-Lacueva, C. (2011), *Phenolic Acids from Microbial Metabolism of Dietary Flavan-3-ols*, Nova Science Publishers.

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.

URL: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.01.004>

Bowey, E., Adlercreutz, H. & Rowland, I. (2003), 'Metabolism of isoflavones and lignans by the gut microflora: a study in germ-free and human flora associated rats', *Food and Chemical Toxicology* **41**(5), 631–636.

URL: [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(02\)00324-1](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00324-1)

Bruneton, J. (2016), *Pharmacognosie*, Lavoisier Paris.

Busquets, S., Ametller, E., Fuster, G., Olivan, M., Raab, V., Argilés, J. & López-Soriano, F. (2007), 'Resveratrol, a natural diphenol, reduces metastatic growth in an experimental cancer model', *Cancer Letters* **245**(1–2), 144–148.

URL: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.12.035>

Bustos, I., García-Cayueta, T., Hernández-Ledesma, B., Peláez, C., Requena, T. & Martínez-Cuesta, 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.

URL: <https://doi.org/10.1021/jf301133g>

Carrier, E., Auchampach, J. & Hillard, C. (2006), 'Inhibition of an equilibrative nucleoside transporter by cannabidiol: A mechanism of cannabinoid immunosuppression', *Proceedings*

of the National Academy of Science of the United States of America **103**(20), 7895–7900.

URL: <https://doi.org/10.1073/pnas.0511232103>

Carter, P., Gray, L., Troughton, J., Khunti, K. & Davies, M. (2010), ‘Fruit and vegetable intake and incidence of type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis’, *the BMJ* **341**.

URL: <https://doi.org/10.1136/bmj.c4229>

Celebioglu, H., Olesen, S., Prehn, K., Lahtinen, S., Brix, S., Hachem, M. & Svensson, B. (2017), ‘Data regarding the growth of lactobacillus acidophilus ncfm on different carbohydrates and recombinant production of elongation factor g and pyruvate kinase’, *Data in Brief* **14**, 117–122.

URL: <https://doi.org/10.1016/j.dib.2017.07.021>

Cheyrier, V. (2005), ‘Polyphenols in foods are more complex than often thought’, *American Journal of Clinical Nutrition* **81**(1), 223–229.

URL: <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.223S>

Cladera, M., Berezo, T., Franch, A., Castell, M. & Cano, F. (2012), ‘Cocoa modulatory effect on rat faecal microbiota and colonic crosstalk’, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **527**(2), 105–112.

URL: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.05.015>

Clarke, G., Stilling, R., Kennedy, P., Stanton, C., Cryan, J. & Dinan, T. (2014), ‘Minireview: Gut microbiota: The neglected endocrine organ’, *Molecular Endocrinology* **28**(8), 1221–1238.

URL: <https://doi.org/10.1210/me.2014-1108>

Crozier, A., Jaganath, I. & Clifford, M. (2009), ‘Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health’, *Natural Product Reports* **26**(8), 1001–1043.

URL: <https://doi.org/10.1039/B802662A>

Cueva, C., Sánchez-Patán, F., Monagas, M., Walton, G., Gibson, G., Martín-Álvarez, P., Bartolomé, B. & Moreno-Arribas, V. (2013), ‘In vitro fermentation of grape seed flavan-3-ol fractions by human faecal microbiota: changes in microbial groups and phenolic metabolites’, *FEMS Microbiology Ecology* **83**(3), 792–805.

URL: <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12037>

- Cummings, J. & Macfarlane, G. (1997), 'Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism', *Journal of Parental Enteral Nutrition* **16**(1), 3–11.
URL: <https://doi.org/10.1177/0148607197021006357>
- Das, S., Lin, H.-S., Ho, P. & Ng, K.-Y. (2008), 'The impact of aqueous solubility and dose on the pharmacokinetic profiles of resveratrol.', *Pharmaceutical Research* **25**(11), 2593–2600.
URL: <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9677-1>
- DeVrese, M. & Marteau, P. (2007), 'Probiotics and prebiotics: Effects on diarrhea', *The Journal of Nutrition* **137**(3), 803–811.
URL: <https://doi.org/10.1093/jn/137.3.803S>
- Dolara, P., Luceri, C., DeFilippo, C., Femia, A., Giovannelli, L., Caderni, G., Cecchini, C., Silvi, S., Orpianesi, C. & Cresci, A. (2005), 'Red wine polyphenols influence carcinogenesis, intestinal microflora, oxidative damage and gene expression profiles of colonic mucosa in f344 rats', *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **591**(1–2), 237–246.
URL: <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.04.022>
- Doskočil, I., Havlík, J., Verlotta, R., Tauchen, J., Veselá, L., Macáková, K., Opletal, L., Kokoška, L. & Rada, V. (2016), 'In vitro immunomodulatory activity, cytotoxicity and chemistry of some central european polypores', *Pharmaceutical Biology* **54**(11), 2369–2376.
URL: <https://doi.org/10.3109/13880209.2016.1156708>
- Doskočil, I., Hošťálková, A., Šafratová, M., Benešová, N., Havlík, J., Havelek, R., Kuneš, J., Královec, K., Chlebek, J. & Cahlíková, L. (2015), 'Cytotoxic activities of amaryllidaceae alkaloids against gastrointestinal cancer cells', *Phytochemistry Letters* **13**(16), 394–398.
URL: <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2015.08.004>
- Evans, C., Miller, N. & Paganga, G. (1996), 'Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids', *Free Radical Biology and Medicine* **20**(7), 933–956.
URL: [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02227-9](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9)
- Farah, A. & Donangelo, C. (2006), 'Phenolic compounds in coffee', *Brazilian Journal of Plant Physiology* **18**(1).
URL: <https://doi.org/10.1590/S1677-04202006000100003>

- Fuchs, C., Giovannucci, E., Colditz, G., Hunter, D., Stampfer, M., Rosner, B., Speizer, F. & Willett, W. (1999), 'Dietary fiber and the risk of colorectal cancer and adenoma in women', *The New England Journal of Medicine* **340**(3), 169–176.
URL: <https://doi.org/10.1056/NEJM199901213400301>
- García-Cayuela, T., Korany, A., Bustos, I., Cadiñanos, L., Requena, T., Peláez, C. & Martínez-Cuesta, C. (2014), 'Adhesion abilities of dairy lactobacillus plantarum strains showing an aggregation phenotype', *Food Research International* **57**, 44–50.
URL: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.010>
- Gharras, H. (2009), 'Polyphenols: food sources, properties and applications — a review', *International Journal of Food Science and Technology* **44**(12), 2512–2518.
URL: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02077.x>
- Gibson, G., Beatty, E., Wang, X. & Cummings, J. (1995), 'Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin', *Gastroenterology* **108**(4), 975–982.
URL: [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(95\)90192-2](https://doi.org/10.1016/0016-5085(95)90192-2)
- Gibson, G. & Roberfroid, M. (1995), 'Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics', *The Journal of Nutrition* **125**(6), 1401–1412.
URL: <https://doi.org/10.1093/jn/125.6.1401>
- Gleinser, M., Grimm, V., Zhurina, D., Yuan, J. & Riedel, C. (2012), 'Improved adhesive properties of recombinant bifidobacteria expressing the bifidobacterium bifidum-specific lipoprotein bopa', *Microbial Cell Factories* **11**(80), 80–94.
URL: <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-80>
- Guarner, F. & Malagelada, J. (2003), 'Gut flora in health and disease', *The Lancet* **361**(9356), 512–519.
URL: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12489-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12489-0)
- Guinane, C. & Cotter, P. (2013), 'Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ', *Therapeutic Advances in Gastroenterology* **6**(4), 295–308.
URL: <https://doi.org/10.1177/1756283X13482996>

- Habtemariam, S. & Dagne, E. (2010), 'Comparative antioxidant, prooxidant and cytotoxic activity of sigmoidin a and eriodictyol', *Planta Medica* **76**(6), 589–594.
URL: <http://aims.fao.org/serials/c58e6f768>
- Hahn, D., Dodge, R. & Golubjatnikov, R. (1991), 'Association of chlamydia pneumoniae (strain twar) infection with wheezing, asthmatic bronchitis, and adult-onset asthma', *The Journal of the American Medical Association* **266**(2), 225–230.
URL: <https://doi.org/10.1001/jama.1991.03470020051031>
- Haidari, F., Rashidi, M., Keshavarz, S., Mahboob, S., Eshraghian, M. & Shahi, M. (2008), 'Effects of onion on serum uric acid levels and hepatic xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase activities in hyperuricemic rats', *Pakistan Journal of Biological Sciences* **11**(14), 1779–1784.
URL: <https://scialert.net/abstract/?doi=pjbs.2008.1779.1784>
- Hammes, W. & Vogel, R. (1995), *The genus Lactobacillus*, Vol. 2, Springer, Boston, MA.
URL: https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5817-0_3
- Hoffmann, C., Dollive, S., Grunberg, S., Chen, J., Li, H., Wu, G., Lewis, J. & Bushman, F. (2013), 'Archaea and fungi of the human gut microbiome: Correlations with diet and bacterial residents', *PLoS ONE* **8**(6).
URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066019>
- Huber, B., Eberl, L., Feucht, W. & Polster, J. (2003), 'Influence of polyphenols on bacterial biofilm formation and quorum-sensing', *Zeitschrift fur Naturforschung C* **58**(11–12), 879–884.
URL: <https://doi.org/10.1515/znc-2003-11-1224>
- Ito, T., Tanaka, T., Iinuma, M., Ichi Nakaya, K., Takahashi, Y., Sawa, R., Murata, J. & Darnaedi, D. (2004), 'Three new resveratrol oligomers from the stem bark of vatica pauciflora', *Journal of Natural Products* **67**(6), 932–937.
URL: <https://doi.org/10.1021/np030236r>
- Jang, M., Cai, L., Udeani, G., Slowing, K., Thomas, C., Beecher, C., Fong, H., Farnsworth, N., Kinghorn, D., Mehta, R., Moon, R. & Pezzuto, J. (1997), 'Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes', *Science* **275**(5297), 218–220.
URL: <https://doi.org/10.1126/science.275.5297.218>

- 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.
URL: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.020>
- Jijon, H., Diaz, J. B. H., Yeung, H., Thiel, D., McKaigney, C., DeSimone, C. & Madsen, K. (2004), 'Dna from probiotic bacteria modulates murine and human epithelial and immune function', *Gastroenterology* **136**(5), 1358–1373.
URL: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.02.003>
- Jirovetz, L., Bail, S., Buchbauer, G., Denkova, Z., Slavchev, A., Stoyanova, A., Schmidt, E. & Geissler, M. (2006), 'Antimicrobial testings, gas chromatographic analysis and olfactory evaluation of an essential oil of hop cones (*humulus lupulus* l.) from bavaria and some of its main compounds', *Scientia Pharmaceutica* **74**(4), 189–201.
- Kadooka, Y., Sato, M., Imaizumi, K., Ogawa, A., Ikuyama, K., Akai, Y., Akai, Y., Okano, M., Kagoshima, M. & Tsuchida, T. (2010), 'Regulation of abdominal adiposity by probiotics (*lactobacillus gasseri* sbt2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial', *European Journal of Clinical Nutrition* **64**, 636–643.
URL: <https://doi.org/10.1038/ejcn.2010.19>
- Kasiotis, K., Pratsinis, H., Kletsas, D. & Haroutounian, S. (2013), 'Resveratrol and related stilbenes: Their anti-aging and anti-angiogenic properties', *Food and Chemical Toxicology* **61**, 112–120.
URL: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.03.038>
- Kaur, C. & Kapoor, H. (2001), 'Antioxidants in fruits and vegetables — the millennium's health', *International Journal of Food Science and Technology* **36**(7), 703–725.
URL: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.00513.x>
- Keeney, K., Yurist-Doutsch, S., Arrieta, M. & Finlay, B. (2014), 'Effects of antibiotics on human microbiota and subsequent disease', *Annual Review of Microbiology* **68**, 217–235.
URL: <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091313-103456>
- Kimura, Y. & Okuda, H. (2001), 'Resveratrol isolated from *polygonum cuspidatum* root prevents tumor growth and metastasis to lung and tumor-induced neovascularization in lewis

lung carcinoma-bearing mice', *The Journal of Nutrition* **131**(6), 1844–1849.

URL: <https://doi.org/10.1093/jn/131.6.1844>

Kumar, S., Kanmani, P., Yuvaraj, N., Paari, A., Pattukumarand, V. & Arul, V. (2011), 'Lactobacillus plantarum as1 binds to cultured human intestinal cell line ht-29 and inhibits cell attachment by enterovirulent bacterium vibrio parahaemolyticus', *Letters in Applied Microbiology* **53**(4), 481–587.

URL: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03136.x>

Lagier, J., Khelaifia, S., Alou, M., Ndongo, S., Dione, N., Hugon, P., Caputo, A., Cadoret, F., Traore, S., Seck, H., Dubourg, G., Durand, G., Mourembou, G., Guilhot, E., Togo, A., Bellali, S., Bachar, D., Cassir, N., Bittar, F., Delerce, J., Mailhe, M., Ricaboni, D., Bilen, M., Niekro, N., Badiane, N., Valles, C., Mouelhi, D., Diop, K., Million, M., Musso, D., Abrahão, J., Azhar, E. I., Bibi, F., Yasir, M., Diallo, A., Sokhna, C., Djossou, F., Vitton, V., Robert, C., Rolain, J., LaScola, B., Fournier, P., Levasseur, A. & Raoult, D. (2016), 'Culture of previously uncultured members of the human gut microbiota by culturomics', *Nature Microbiology* **1**.

URL: <http://dx.doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.203>

Langcake, P. & Pryce, R. (1976), 'The production of resveratrol by vitis vinifera and other members of the vitaceae as a response to infection or injury', *Physiological Plant Pathology* **9**(1), 77–86.

URL: [https://doi.org/10.1016/0048-4059\(76\)90077-1](https://doi.org/10.1016/0048-4059(76)90077-1)

Laparra, J. & Sanz, Y. (2009), 'Comparison of in vitro models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelium.', *Letters in Applied Microbiology*. **49**(6), 695–701.

URL: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02729.x>

Larrosa, M., Yañez-Gascón, M., Selma, M., González-Sarrías, A., Toti, S., Cerón, J., Tomás-Barberán, F., Dolara, P. & Espín, J. (2009), 'Effect of a low dose of dietary resveratrol on colon microbiota, inflammation and tissue damage in a dss-induced colitis rat model', *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**(6), 2211–2220.

URL: <https://doi.org/10.1021/jf803638d>

Lebeer, S., Vanderleyden, J. & DeKeersmaecker, S. (2008), 'Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action', *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **72**(4), 728–764.

URL: <https://doi.org/10.1128/MMBR.00017-08>

- Lee, M., Thomas, J., Wang, H., Chang, C., Lin, C. & Lin, H. (2012), 'Extraction of resveratrol from polygonum cuspidatum with magnetic orcinol-imprinted poly(ethylene-co-vinyl alcohol) composite particles and their in vitro suppression of human osteogenic sarcoma (hos) cell line', *Journal of Materials Chemistry* **22**(47), 24644–24651.
URL: <https://doi.org/10.1039/C2JM34244H>
- Lee, S. & Kader, A. (2000), 'Preharvest and postharvest factors influencing vitamin c content of horticultural crops', *Postharvest Biology and Technology* **20**(3), 207–220.
URL: [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(00\)00133-2](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(00)00133-2)
- Lesuffleur, T., Porchet, N., Aubert, J., Swallow, D., Gum, J., Kim, Y., Real, F. & Zweibaum, A. (1993), 'Differential expression of the human mucin genes muc1 to muc5 in relation to growth and differentiation of different mucus-secreting ht-29 cell subpopulations', *Journal Cell Science* **106**(3), 771–783.
URL: <http://jcs.biologists.org/content/106/3/771>
- Leteurtre, E., Gouyer, V., Rousseau, K., Moreau, O., Barbat, A., Swallow, D., Huet, G. & Lesuffleur, T. (2012), 'Differential mucin expression in colon carcinoma ht-29 clones with variable resistance to 5-fluorouracil and methotrexate', *Biology of the Cell* **92**(2), 145–151.
URL: <https://doi.org/10.1016/j.biolcel.2003.12.005>
- Leung, H., Lin, C., Hour, M., Yang, W., Wang, M. & Lee, H. (2007), 'Kaempferol induces apoptosis in human lung non-small carcinoma cells accompanied by an induction of antioxidant enzymes', *Food and Chemical Toxicology* **45**(10), 2005–2013.
URL: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.04.023>
- Ley, B. (2001), *Medicinal Mushrooms for Immune Enhancement*, BL Publications, Detroit Lakes, MN.
- Li, N., Liu, J., Zhang, J. & Yu, B. (2008), 'Comparative evaluation of cytotoxicity and antioxidative activity of 20 flavonoids', *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**(10), 3876–3883.
URL: <https://doi.org/10.1021/jf073520n>
- Li, Y., Li, Z., Zhao, W., Wen, R., Meng, Q. & Zeng, Y. (2006), 'Synthesis of stilbene derivatives with inhibition of sars coronavirus replication', *European Journal of Medicinal Chemistry*

41(9), 1084–1089.

URL: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2006.03.024>

Lilly, D. & Stillwell, R. (1965), 'Probiotics: Growth-promoting factors produced by microorganisms', *Science* **147**(3659), 747–748.

URL: <https://doi.org/10.1126/science.147.3659.747>

Lippi, G., Blanckaert, N., Bonini, P., Green, S., Kitchen, S., Palička, V., Vassault, A. & Plebani, M. (2008), 'Haemolysis: an overview of the leading cause of unsuitable specimens in clinical laboratories', *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* **46**(6), 764–772.

URL: <https://doi.org/10.1515/CCLM.2008.170>

Lippi, G., Franchini, M. & Guidi, G. (2010), 'Red wine and cardiovascular health the french paradox', *International Journal of Wine Research* **2**, 1–7.

URL: <https://doi.org/10.2147/IJWR.S8159>

Lugasi, A. & Hóvári, J. (2003), 'Antioxidant properties of commercial alcoholic and nonalcoholic beverages.', *Molecular Nutrition Food Research* **47**(2), 79–86.

URL: <https://doi.org/10.1002/food.200390031>

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), 230–242.

URL: <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.230S>

Marques, T., Cryan, J., Shanahan, F., Fitzgerald, G., Ross, R., Dinan, T. & Stanton, C. (2014), 'Gut microbiota modulation and implications for host health: Dietary strategies to influence the gut–brain axis', *Innovative Food Science Emerging Technologies* **22**, 239–247.

URL: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.10.016>

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.

URL: [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00723-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00723-7)

Mital, B. & Garg, S. (1992), 'Acidophilus milk products: Manufacture and therapeutics', *Food*

Reviews International **8**(3), 347–389.

URL: <https://doi.org/10.1080/87559129209540946>

Montrose, D. & Floch, M. (2005), 'Probiotics used in human studies', *Journal of Clinical Gastroenterology* **39**(6), 469–484.

URL: <https://doi.org/10.1097/01.mcg.0000165649.32371.71>

Moos, W., Faller, D., Harpp, D., Kanara, I., Pernokas, J., Powers, W. & Steliou, K. (2016), 'Microbiota and neurological disorders: A gut feeling', *BioResearch Open Access* **5**(1), 137–145.

URL: <https://doi.org/10.1089/biores.2016.0010>

Murtaza, B., Berrichi, M., Bennamar, C., Tordjmann, T., Djeziri, F., Hichami, A., Leemput, J., Belarbi, M., Ozdener, H. & Khan, N. (2017), 'Zizyphin modulates calcium signalling in human taste bud cells and fat taste perception in the mouse', *Fundamental Clinical Pharmacology* **31**(5), 486–494.

URL: <https://doi.org/10.1111/fcp.12289>

Musilová, Š., Modráčková, N., Doskočil, I., Svejstil, R. & Rada, V. (2017), 'Influence of human milk oligosaccharides on adherence of bifidobacteria and clostridia to cell lines', *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* **64**(4), 415–422.

URL: <https://doi.org/10.1556/030.64.2017.029>

Naczjk, M. & Shahidi, F. (2006), 'Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis.', *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **41**(5), 1523–1542.

URL: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.04.002>

Nahaisi, M. (1986), 'Lactobacillus acidophilus: therapeutic properties, products and enumeration', *Developments in food microbiology* **2**, 153–178.

URL: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301423037>

Nielsen, J. & Gilliland, S. (1992), 'The lactose hydrolyzing enzyme from lactobacillus acidophilus', *Cultured dairy products journal of the American Cultured Dairy Products Institute* **27**(1), 20–28.

URL: <http://aims.fao.org/serials/c0a3357fc>

- Nijveldt, R., VanNood, E., VanHoorn, D., Boelens, P., VanNorren, K. & VanLeeuwen, P. (2001), 'Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications', *The American Journal of Clinical Nutrition* **74**(4), 418–425.
URL: <https://doi.org/10.1093/ajcn/74.4.418>
- O'Mahony, S., Clarke, G., Borre, Y., Dinan, T. & Cryan, J. (2015), 'Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis', *Behavioural Brain Research* **277**, 32–48.
URL: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.07.027>
- Palmer, C., Bik, E., DiGiulio, D., Relman, D. & Brown, P. (2007), 'Development of the human infant intestinal microbiota', *PLoS Biology* **5**(7).
URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050177>
- Parkar, S., Stevenson, D. & Skinner, M. (2008), 'The potential influence of fruit polyphenols on colonic microflora and human gut health', *International Journal of Food Microbiology* **124**(3), 295–298.
URL: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.017>
- Parker, R. (1974), 'Probiotics, the other half of the antibiotics story', *Animal Nutrition and Health* **29**, 4–8.
URL: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-84995174128origin=inwardtxGid=915ea2b3a3d30f6e8c5c4d9eadc9a075>
- Pastene, E., Speisky, H., 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.
URL: <https://doi.org/10.1021/jf100274g>
- Pickard, J., Maurice, C., Kinnebrew, M., Abt, M., Schenten, D., Golovkina, T., Bogatyrev, S., Ismagilov, R., Pamer, E., Turnbaugh, P. & Chervonsky, A. (2014), 'Rapid fucosylation of intestinal epithelium sustains host–commensal symbiosis in sickness', *Nature — International Journal of Science* **514**(7524), 638–641.
URL: <https://doi.org/10.1038/nature13823>
- Pimiä, R., Nohynek, L., Schmidlin, S., Kähkönen, M., Heinonen, M., Riihinen, K. & Caldentey, K. (2005), 'Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens', *Journal of*

- Applied Microbiology* **98**(4), 991–1000.
URL: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02547.x>
- Potter, J., Slattery, M., Bostick, R. & Gapstur, S. (1993), ‘Colon cancer: A review of the epidemiology’, *Epidemiologic Reviews* **15**(2), 499–545.
URL: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.epirev.a036132>
- Pregliasco, F., Anselmi, G., Fonte, L., Giussani, F., Schieppati, S. & Soletti, L. (2008), ‘A new chance of preventing winter diseases by the administration of synbiotic formulations’, *Journal of Clinical Gastroenterology* **42**, 224–233.
URL: <https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e31817e1c91>
- Qiao, Y., Sun, J., Xia, S., Tang, X., Shia, Y. & Le, G. (2014), ‘Effects of resveratrol on gut microbiota and fat storage in a mouse model with high-fat-induced obesity’, *Food Function* **5**(6), 1241–1249.
URL: <https://doi.org/10.1039/C3FO60630A>
- Rasic, J. & Kurmann, J. (1983), *Bifidobacteria and their role*, Vol. 39, Springer Basel AG.
- Rawel, H. & Kulling, S. (2007), ‘Nutritional contribution of coffee, cacao and tea phenolics to human health’, *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* **2**(4), 399–406.
URL: <https://doi.org/10.1007/s00003-007-0247-y>
- Rolfe, R. (2000), ‘The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health’, *The Journal of Nutrition* **132**(2), 396–402.
URL: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20001420444>
- Roupe, K., Remsberg, C., Yanez, J. & Davies, N. (2006), ‘Pharmacometrics of stilbenes: Se-
going towards the clinic’, *Current Clinical Pharmacology* **1**(1), 81–101.
URL: <https://doi.org/10.2174/157488406775268246>
- Russell, A., Wexler, A., Harding, B., Whitney, J., Bohn, A., Goo, Y., Tran, B., Barry, N., Zheng, H., Peterson, B., Chou, S., Gonen, T., Goodlett, D., Goodman, A. & Mougous, J. (2014), ‘A type vi secretion-related pathway in bacteroidetes mediates interbacterial antagonism’, *Cell Host Microbe* **16**(2), 227–236.
URL: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.07.007>

- Santos-Buelga, C. & Scalbert, A. (2000), 'Proanthocyanidins and tannin-like compounds: nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health', *Journal of Food and Agriculture* **80**(7), 1094–1117.
- URL:** [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<1094::AID-JSFA569>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1094::AID-JSFA569>3.0.CO;2-1)
- Saxelin, M., Blum, S., Reniero, R., Schiffrin, E., Crittenden, R., Sandholm, T., Ouwehand, A., Salminen, S., VonWright, A., Saarela, M., Collins, K. & Morelli, L. (2010), 'Adhesion studies for probiotics: need for validation and refinement', *Trends in Food Science Technology* **10**(12), 405–410.
- URL:** [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)00028-5](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)00028-5)
- Scalbert, A. & Williamson, G. (2000), 'Dietary intake and bioavailability of polyphenols', *The Journal of Nutrition* **130**(8), 2073–2085.
- URL:** <https://doi.org/10.1093/jn/130.8.2073S>
- Schwabe, R. & Jobin, C. (2013), 'The microbiome and cancer', *Nature Reviews: Cancer* **13**(11), 800–812.
- URL:** <https://doi.org/10.1038/nrc3610>
- Selma, M., Espín, J. & Barberán, F. (2009), 'Interaction between phenolics and gut microbiota: Role in human health', *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**(15), 6485–6501.
- URL:** <https://doi.org/10.1021/jf902107d>
- Selma, M., Larrosa, M., Beltrán, D., Lucas, R., Morales, J., Tomás-Barberán, F. & Espín, J. (2012), 'Resveratrol and some glucosyl, glucosylacyl, and glucuronide derivatives reduce escherichia coli o157:h7, salmonella typhimurium, and listeria monocytogenes scott a adhesion to colonic epithelial cell lines', *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**(30), 7367–7374.
- URL:** <https://doi.org/10.1021/jf203967u>
- Sgorbati, B., Biavati, B. & Palenzona, D. (1995), *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, Vol. 2, Springer, Boston, MA.
- URL:** <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5817-0>
- Sharma, S., Chopra, K. & Kulkarni, S. (2007), 'Effect of insulin and its combination with resveratrol or curcumin in attenuation of diabetic neuropathic pain: participation of nitric oxide

and tnf-alpha', *Phytother Res* **21**(3), 278–283.

URL: <https://doi.org/10.1002/ptr.2070>

Smith, A., Zoetendal, E. & Mackie, R. (2005), 'Bacterial mechanisms to overcome inhibitory effects of dietary tannins', *Microbial Ecology* **50**(2), 197–205.

URL: <https://doi.org/10.1007/s00248-004-0180-x>

Söderling, E., Alaräisänen, L., Scheinin, A. & Mäkinen, K. (1987), 'Effect of xylitol and sorbitol on polysaccharide production by and adhesive properties of streptococcus mutans', *Caries Research* **21**(2), 109–116.

URL: <https://doi.org/10.1159/000261011>

Steed, H., Macfarlane, G. T. & Macfarlane, S. (2008), 'Prebiotics, synbiotics and inflammatory bowel disease', *Molecular Nutrition Food Research* **52**(8), 898–905.

URL: <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700139>

Stevens, J. & Page, J. (2004), 'Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health!', *Phytochemistry* **65**(10), 1317–1330.

URL: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.04.025>

Sugimura, Y., Hagi, T. & Hoshino, T. (2011), 'Correlation between in vitro mucus adhesion and the in vivo colonization ability of lactic acid bacteria: Screening of new candidate carp probiotics', *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **75**(3), 511–515.

URL: <https://doi.org/10.1271/bbb.100732>

Szabó, G. (2009), 'A glass of red wine to improve mitochondrial biogenesis? novel mechanisms of resveratrol', *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology* **297**(1), 8–9.

URL: <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00471.2009>

Takayama, M., Fukai, T., Ichikawa, K. & Nomura, T. (1991), 'Identification of prenylated flavonoids using fast-atom bombardment mass spectrometry', *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **5**(2), 67–69.

URL: <https://doi.org/10.1002/rcm.1290050204>

Tamboli, C. P., Neut, C., Desreumaux, P. & Colombel, J. F. (2004), 'Dysbiosis in inflammatory

bowel disease’, *Gut* **53**(1), 1–4.

URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1773911/?report=classic>

Tauchen, J., Bortl, L., Huml, L., Miksatkova, P., Doskočil, I., Marsik, P., Villegas, P., Flores, Y., VanDamme, Y., Lojka, B., Havlik, J., Lapcik, O. & Kokoska, L. (2016), ‘Phenolic composition, antioxidant and anti-proliferative activities of edible and medicinal plants from the peruvian amazon’, *Revista Brasileira de Farmacognosia* **26**(6), 728–737.

URL: <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.03.016>

Tauchen, J., Doskočil, I., Caffi, C., Lulekal, E., Maršík, P., Havlík, J., VanDamme, P. & Kokoška, L. (2015), ‘In vitro antioxidant and anti-proliferative activity of ethiopian medicinal plant extracts’, *Industrial Crops and Products* **74**, 671–679.

URL: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.068>

Tlaskalová, H. & Městský, J. (2012), ‘Účast slizničního imunitního systému a komensálních bakterií v alergii’, *Alergie* **14**(2), 124–133.

URL: <http://www.medvik.cz/link/bmc12023947>

Toivanen, M., Huttunen, S., Lapinjoki, S. & Tikkanen-Kaukanen, C. (2011), ‘Inhibition of adhesion of neisseria meningitidis to human epithelial cells by berry juice polyphenolic fractions’, *Phytotherapy Research* **25**(6), 828–832.

URL: <https://doi.org/10.1002/ptr.3349>

Tuomola, E., Ouwehand, A. & Salminen, S. (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.

URL: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00319-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00319-6)

Tzounis, X., Vulevic, J., Kuhnle, G., George, T., Leonczak, J., Gibson, G., Uribe, C. & Spencer, J. (2008), ‘Flavanol monomer-induced changes to the human faecal microflora’, *British Journal of Nutrition* **99**(4), 782–792.

URL: <https://doi.org/10.1017/S0007114507853384>

Valdameri, G., Trombetta-Lima, M., Worfel, P., Pires, A., Martinez, G., Noletto, G., Cadena, S., Sogayar, M., Winnischofer, S. & Rocha, M. (2011), ‘Involvement of catalase in the apoptotic

mechanism induced by apigenin in hepg2 human hepatoma cells', *Chemico-Biological Interactions* **193**(2), 180–189.

URL: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2011.06.009>

Vaněčková, N., Hošťálková, A., Šafratová, M., Kuneš, J., Hulcová, D., Hrabínová, M., Doskočil, I., Štěpánková, Š., Opletal, L., Nováková, L., Jun, D., Chlebek, J. & Cahlíková, L. (2016), 'Isolation of amaryllidaceae alkaloids from nerine bowdenii w. watson and their biological activities', *RSC Advances* **83**(6), 80114–80120.

URL: <https://doi.org/10.1039/C6RA20205E>

VanLoo, J., Cummings, J., Delzenne, N., Englyst, H., Franck, A., Hopkins, M., Kok, N., Macfarlane, G., Newton, D., Quigley, M., Roberfroid, M., VanVliet, T. & VanDenHeuvel, E. (1999), 'Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: A consensus report from the endo project (dxxii airii-ct94-1095)', *British Journal of Nutrition* **81**(2), 121–132.

URL: <https://doi.org/10.1017/S0007114599000252>

Vélez, M., DeKeersmaecker, S. & Vanderleyden, J. (2007), 'Adherence factors of lactobacillus in the human gastrointestinal tract', *FEMS Microbiology Letters* **276**(2), 140–148.

URL: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00908.x>

Velíšek, J. & Hajšlová, J. (2009), *Chemie potravin*, Vol. 3, OSSIS — Ing. Václav Šedivý.

Vendrame, S., Guglielmetti, S., Riso, P., Arioli, S., Klimis-Zacas, D. & Porrini, M. (2011), 'Six-week consumption of a wild blueberry powder drink increases bifidobacteria in the human gut', *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**(24), 12815–12820.

URL: <https://doi.org/10.1021/jf2028686>

Viveros, A., Chamorro, S., Pizarro, M., Arija, I., Centeno, C. & Brenes, A. (2011), 'Effects of dietary polyphenol-rich grape products on intestinal microflora and gut morphology in broiler chicks', *Poultry Science* **90**(3), 566–578.

URL: <https://doi.org/10.3382/ps.2010-00889>

Volštatová, T., Havlík, J., Doskočil, I., Geigerová, M. & Rada, V. (2015), 'Effect of hydrolyzed milk on the adhesion of lactobacilli to intestinal cells', *Scientia Agriculturae Bohemica* **46**(1).

URL: <https://doi.org/10.1515/sab-2015-0012>

- Volšátová, T., Maršík, P., Rada, V., Geiderová, M. & Havlík, J. (2017), 'Effect of apple extracts and selective polyphenols on the adhesion of potential probiotic strains of lactobacillus gasseri and lactobacillus casei fmp', *Journal of Functional Foods* **35**, 391–397.
URL: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.06.005>
- Voreades, N., Kozil, A. & Weir, T. (2014), 'Diet and the development of the human intestinal microbiome', *Frontiers in Microbiology* **5**, 494.
URL: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00494>
- Walle, T., Hsieh, F., DeLegge, M., Oatis, J. & Walle, K. (2004), 'High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans', *Drug Metabolism and Disposition* **32**(12), 1377–1382.
URL: <https://doi.org/10.1124/dmd.104.000885>
- 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.
URL: <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9148-2>
- Wang, I., Catana, F. & Yang, Y. (2002), 'An lc-ms method for analyzing total resveratrol in grape juice, cranberry juice, and in wine', *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**(3), 431–435.
URL: <https://doi.org/10.1021/jf010812u>
- Yamakoshi, J., Toutake, S., Kikuchi, M., Kubota, Y., Konishi, H. & Mitsuoka, T. (2001), 'Effect of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds on human fecal flora and fecal odor', *Microbial Ecology in Health and Disease* **13**(1), 25–31.
URL: <https://doi.org/10.1080/089106001750071672>
- Yamamoto, M. & Matsumoto, S. (2016), 'Gut microbiota and colorectal cancer', *Genes and Environment* **38**, 11.
URL: <https://doi.org/10.1186/s41021-016-0038-8>
- Yao, L., Jiang, Y., Shi, J., Barberán, F., Datta, N., Singanusong, R. & Chen, S. (2004), 'Flavonoids in food and their health benefits', *Plant Foods for Human Nutrition* **59**(3), 113–122.
URL: <https://doi.org/10.1007/s11130-004-0049-7>

Zamora-Ros, R., Agudo, A., Barroso, L., Romieu, I., Ferrari, P., Knaze, V., de Mesquita, H. B., Leenders, M., Travis, R., Navarro, C., Sánchez-Cantalejo, E., Slimani, N., Scalbert, A., Ferdirko, V., Hjartåker, A., Engeset, D., Skeie, G., Boeing, H., Förster, J., Li, K., Teucher, B., Agnoli, C., Tumino, R., Mattiello, A., Saieva, C., Johansson, I., Stenling, R., Redondo, M. L., Wallström, P., Ericson, U., Khaw, K.-T., Mulligan, A., Trichopoulou, A., Dilis, V., Katsoulis, M., Peeters, P., Igali, L., Tjønneland, A., Halkjær, J., Touillaud, M., Perquier, F., Fagherazzi, G., Amiano, P., Ardanaz, E., Bredsdorff, L., Ricceri, K. O. F., Riboli, E. & González, C. (2012), 'Dietary flavonoid and lignan intake and gastric adenocarcinoma risk in the european prospective investigation into cancer and nutrition (epic) study', *The American Journal of Clinical Nutrition* **96**(6), 1398–1408.

URL: <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.037358>

Seznam zkratek

Acc1 acetyl-CoA karboxyláza

Cnb calcineurin B protein

DMEM Dulbecco's Modified Eagle's Medium

FBS fetální bovinní sérum

FMT fekální mikrobiální transplantace

GI gastrointestinální

IBD idiopatické střevní záněty (Inflammatory Bowel Disease)

LAB bakterie mléčného kvašení

LDL lipoprotein s nízkou hustotou

mRNA Lpl lipoproteinová lipáza mediátorové ribonukleové kyseliny

MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid

NFκB nukleární faktor κB

PBS fosfátový pufr

Ppar-γ peroxisomový proliferátor — aktivovaný receptor

RNS reaktivní forma dusíku

ROS reaktivní forma kyslíku

Scd1 stearoyl-CoA desaturáza

Seznam obrázků

3.1	Střevní mikrobiom	5
3.2	Bifidobacterium	10
5.1	Test životaschopnosti	22
5.2	Adherence bakterií	23

Rejstřík

- Archaea, 5, 6
- Bacillus bifidus, 10
- Bacteroides, 30
 - uniformis, 30
- Bacteroidetes, 14, 18
- Bifidobacterium, 6, 10, 18, 29, 30
- Blautia coccoides, 30
- Borrelia burgdorferi, 7
- Candida, 6
- Chlamydia psittaci, 7
- Cladosporium, 6
- Clostridium, 14, 29
 - coccoides, 29
 - difficile, 30
 - histolyticum, 29
 - leptum cluster, 30
 - perfringens, 30
- Corynebacterium, 6
- Cyperaceae, 17
- Dipterocarpaceae, 17
- Eggerthella lenta, 30
- Enterococcus, 30
 - faecalis, 18
- Escherichia coli, 9, 24, 27, 29
 - P-fimbriated, 27
- Eubacterium, 14, 29
- Firmicutes, 14, 18
- Gnetaceae, 17
- Helicobacter pylori, 7, 27
- In cellulo, 25
- In vitro, 14, 18, 25, 27, 29, 30
- In vivo, 25, 28, 29
- Lactobacillus, 4, 6, 10, 18, 29, 30
 - acidophilus, 10, 11, 26
 - brevis, 11
 - buchneri, 11
 - casei, 9, 11, 26
 - crispatus, 11
 - curvatus, 11
 - delbrueckii, 11
 - fermentum, 4, 11, 19, 23, 25
 - gasseri, 11, 25, 31
 - johnsonii, 11
 - kefir, 11
 - panis, 11
 - paracasei, 11
 - pentosus, 11

plantarum, 4, 9, 11, 19, 23, 25, 26, 31
rhamnosus, 11
salivarius, 11
Leguminosae, 17
Listeria monocytogenes, 9, 27
Methanobrevibacter smithii, 6
Neisseria
 meningitidis, 30
 meningitidis pili, 27
Polygonum cuspidatum, 16
Prevotella, 30
Propionibacterium, 6
Saccharomyces, 6
Salmonella
 enterica, 7
 typhimurium, 27
Staphylococcus, 6
Streptococcus mutans, 27
Vibrio cholerae, 24
Vitaceae, 17