



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ**

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**PŘÍPRAVA PŘÍRODNÍCH DOPLŇKŮ STRAVY S  
OBSAHEM PROBIOTICKÝCH BAKTERIÍ A LÁTEK S  
PROTIZÁNĚTLIVÝM ÚČINKEM**

PREPARATION OF FOOD SUPPLEMENT CONTAINING PROBIOTIC BACTERIA AND COMPONENTS WITH  
ANTI-INFLAMMATORY EFFECT

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

MASTER'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Bc. Nikola Horňáková**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**Ing. Petra Matoušková, Ph.D.**

**BRNO 2020**

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1430/2019 Akademický rok: 2019/20  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Bc. Nikola Horňáková**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie  
Vedoucí práce: **Ing. Petra Matoušková, Ph.D.**

### Název diplomové práce:

Příprava přírodních doplňků stravy s obsahem probiotických bakterií a látek s protizánětlivým účinkem

### Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí cíle:

- 1) Výběr, charakterizace a izolace zvolených aktivních látek
- 2) Enkapsulace zvolených aktivních látek, probiotik a jejich směsí
- 3) Návrh optimálního složení doplňků stravy s obsahem zvolených protizánětlivých látek a probiotik

### Termín odevzdání diplomové práce: 31.7.2020:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

-----  
Bc. Nikola Horňáková  
student(ka)

-----  
Ing. Petra Matoušková, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## ABSTRAKT

Predložená diplomová práca sa zaoberá problematikou chronických zápalových ochorení tráviacej sústavy a navrhuje možnosť alternatívneho zlepšenia stavu, resp. podporení remisnej fázy pomocou probiotických preparátov obohatených prírodnými protizápalovými látkami. Phytochemikálie, najmä fenolické zlúčeniny, ich flavonoidná podskupina a karotenoidy, potláčajú nežiaduce zápalové procesy priamym ovplyvnením imunitných buniek alebo inhibíciou škodlivého oxidatívneho stresu. Z tohto dôvodu boli k ďalším analýzám zvolené rastliny s predpokladom vysokého obsahu daných biologicky aktívnych zlúčenín. Konkrétne sa jednalo o brusnicu čučoriedkovú (*Vaccinium myrtillus*), brusnicu pravú (*Vaccinium vitis-idaea*), kurkumu pravú (*Curcuma longa*), mäta piepornú (*Mentha piperita*), rumanček pravý (*Matricaria recutita*), škoricu ceylonskú (*Cinnamomum zeylanicum*), zázvor pravý (*Zingiber officinale*) a ľan siaty (*Linum usitatissimum*). Následne z nich boli pripravené tri typy extraktov s použitím vody, 20% etanolu a hexánu ako extrakčných činidiel. Extrakty boli podrobené stanoveniu obsahu celkových i konkrétnych fenolických látok, celkových flavonoidov a celkových karotenoidov. Táto charakteristika bola doplnená i o antioxidačnú aktivitu vodných a etanolových extraktov. Následne bola pozorovaná interakcia jednotlivých vzoriek s probiotickými kultúrami (*Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus acidophilus*) a schopnosť extraktov ovplyvniť viabilitu probiotík v procese modelového trávenia. Z týchto čiastkových charakterizácií boli vybrané najzaujímavejšie vzorky. Konkrétne sa jednalo o vodné extrakty čučoriedok, mäty, harmančeka a škorice. Ich prípadná cytotoxicita voči ľudským črevným epiteliálnym bunkám bola *in vitro* overená pomocou MTT testu s využitím bunkovej línie CaCo-2. Extrakty vykazujúce najvyššie hodnoty prospešných phytochemikálií a antioxidačnej aktivity, neinhibujúce rast probiotických kultúr a nevykazujúce cytotoxické pôsobenie na ľudské črevné bunky boli potom koenkapsulované spolu s probiotikami do alginátových častíc o priemere 1 mm. Boli zvolené vodné extrakty mäty, harmančeka a škorice. U častíc bola testovaná enkapsulačná účinnosť probiotík a fenolických látok. Ďalej boli podrobené modelovému tráveniu, kedy bolo pozorované uvoľňovanie žiadúcich látok v jednotlivých častiach tráviaceho systému a zhodnotené, či sa potrebné časti dostanú do požadovaného miesta pôsobenia – hrubého čreva. Pre využitie navrhnutého probiotického preparátu ako doplnku výživy bola určená doporučená dávka 1 g. Z hľadiska dlhodobého skladovania, predĺženia trvanlivosti a zvýšenia ochrany nestabilných biologicky aktívnych zložiek boli navrhnuté prípadné úpravy častíc lyofilizáciou alebo obohatením polymérneho obalového materiálu častíc o ďalšiu ochrannú vrstvu, napr. chitosan.

## KEÚČOVÉ SLOVÁ

*prírodné protizápalové látky, probiotiká, bioaktívne zlúčeniny, enkapsulácia, alginátové častice, modelové trávenie, cytotoxicita, chronický zápal, IBD, dysbióza, črevná mikrobiota*

## ABSTRACT

The presented thesis discusses the issues of chronic inflammatory diseases of the digestive system and suggests the possibility of the alternative natural remedies improving the health conditions or prolonging the remission phase of IBD. The main goal is to design a probiotic supplement enriched by natural anti-inflammatory agents. Phytochemicals, concretely phenolic compounds, flavonoids, and carotenoids suppress harmful inflammatory processes by direct targeting the function of the immune cells or by inhibiting damaging oxidative stress in general. Therefore, there were several plants potentially rich for these biologically active substances selected. Concretely, blueberry (*Vaccinium myrtillus*), lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea*), turmeric (*Curcuma longa*), peppermint (*Mentha piperita*), chamomile (*Matricaria recutita*), cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*), ginger (*Zingiber officinale*) and flax (*Linum usitatissimum*). The suitable parts of these plants were extracted by using a total of three different solvents – water, ethanol, and hexane for obtaining lipidic extracts. The concentration of total polyphenols, total flavonoids, total carotenoids, and the ascertainment of specific polyphenols was determined in the prepared extracts. These characteristics were enhanced by the measurement of antioxidant activity of the aqueous and ethanolic extracts. The interaction of individual samples with probiotic cultures (*Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus acidophilus*) and the ability of extracts to influence the viability of probiotics in the model digestion process has been examined. The most interesting samples (aqueous extracts of blueberries, mint, chamomile, and cinnamon) were selected for further experiments. The possible cytotoxicity towards human intestinal epithelial cells was tested *in vitro* by the MTT tests utilizing the CaCo-2 cell line. Extracts showing the highest levels of beneficial phytochemicals and antioxidant activity, supporting the growth of probiotic cultures, and showing minimal cytotoxic effects on human intestinal cells were then co-encapsulated with probiotics into alginate particles of a diameter of 1 mm. Water extracts of mint, chamomile, and cinnamon have been chosen. The encapsulation efficiency of successfully entrapped probiotics and phenolic compounds was determined in prepared particles. Furthermore, the particles were studied during the process of model digestion, when the release of the desired substances in the various parts of the digestive system was observed and assessed whether the components would reach the crucial point of action – the colon. For the use of the proposed probiotic mixture as a dietary supplement, a recommended dose of 1 g has been determined. Lastly, possible adjustments such as lyophilization or sheathing by an extra protective polymeric layer, e.g. chitosan, were suggested to prolong the shelf life of the particles and volatile substances stability.

## KEYWORDS

*natural anti-inflammatory substances, probiotics, bioactive compounds, encapsulation, alginate gel particles, digestion model, cytotoxicity, chronic inflammation, IBD, dysbiosis, gut microbiota*

HORŇÁKOVÁ, Nikola. *Příprava přírodních doplňku stravy s obsahem probiotických bakterií a látek s protizánětlivým účinkem*. Brno, 2020. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123827>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Petra Matoušková.

## Prehlásenie

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....  
podpis študenta

## Pod'akovanie

*Rada by som využila týchto pár riadkov a veľmi sa poďakovala predovšetkým mojej vedúcej diplomovej práce Ing. Petre Matouškovej, Ph.D. nielen za možnosť pracovať pod jej skvelým a profesionálnym vedením, ale najmä za jej ľudský, milý, trpezlivý a ochotný prístup. Taktiež som nesmierne vďačná za obrovskú pomoc mojej konzultantke Ing. Julii Hoovej, ktorá mi vždy s úsmevom pomohla zdolať akýkoľvek laboratórny problém. Špeciálne poďakovanie patrí i vedeniu fakulty a Romane Němcovej, ktorí preukázali, že im na študentoch skutočne záleží a veľmi ochotne mi pomohli i v náročnejšej životnej situácii. Ďalej sa chcem poďakovať maminke, sestre a všetkým, ktorí stáli pri mne a podporovali ma po celú dobu môjho štúdia. And last but not least thanks belongs to Scott, who believed in me till the very end.*

# OBSAH

1	ÚVOD .....	8
2	TEORETICKÁ ČASŤ .....	9
2.1	Ľudská mikrobiota.....	9
2.1.1	Epifytická flóra tráviacej sústavy človeka.....	9
2.1.2	Látky produkované črevnou mikrobiotou .....	11
2.1.3	Chronický zápal .....	15
2.1.4	Idiopatické zápaly čriev .....	15
2.2	Probiotiká .....	17
2.2.1	Pozitívne vplyvy probiotík na organizmus.....	18
2.2.2	Možné riziká pri užívaní probiotických prípravkov .....	20
2.2.3	Najčastejšie využívané probiotické baktérie .....	21
2.3	Prebiotiká a synbiotiká .....	22
2.4	Prírodné protizápalové látky.....	23
2.4.1	Fytochemikálie a imunitný systém.....	23
2.4.2	Fenolické zlúčeniny .....	25
2.4.3	Karotenoidy.....	28
2.4.4	Vybrané druhy rastlín s vysokým obsahom protizápalových látok.....	28
2.5	Enkapsulácia v potravinárskom priemysle .....	31
3	CIEĽ PRÁCE.....	34
4	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ .....	35
4.1	Použité látky a prístroje .....	35
4.1.1	Protizápalové látky.....	35
4.1.2	Použité mikroorganizmy .....	35
4.1.3	Použitá bunková línia.....	35
4.1.4	Použité chemikálie .....	36
4.1.5	Prístroje a pomôcky.....	37
4.2	Špecifikácia použitých rastlinných extraktov .....	37
4.2.1	Príprava extraktov pre analýzu.....	37
4.2.2	Stanovenie celkového obsahu fenolických zlúčenín.....	38
4.2.3	Stanovenie celkových flavonoidov .....	39
4.2.4	Stanovenie jednotlivých flavonoidov metódou RP-HPLC s UV-VIS detekciou.....	39
4.2.5	Stanovenie celkových karotenoidov.....	40
4.2.6	Stanovenie antioxidačnej aktivity .....	40
4.3	Kultivácia probiotických baktérií .....	40
4.4	Priama interakcia rastlinných extraktov s probiotikami .....	40

4.5	Modelové trávenie zmesí obsahujúcich kombináciu extraktov a probiotík .....	41
4.5.1	Príprava modelových tráviacich štiav .....	41
4.5.2	Stanovenie viability buniek počas trávenia pomocou zákalu.....	41
4.6	Testovanie extraktov na ľudských črevných epiteliálnych bunkách <i>in vitro</i> .....	42
4.6.1	Kultivácia bunkovej línie CaCo-2.....	42
4.6.2	MTT test.....	42
4.7	Enkapsulácia.....	43
4.7.1	Príprava alginátových častíc.....	43
4.7.2	Stanovenie enkapsulačnej účinnosti.....	44
4.7.3	Stanovenie stability častíc pri prechode modelovým tráviacim traktom.....	44
5	VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	45
5.1	Charakterizácia rastlinných extraktov .....	45
5.1.1	Stanovenie celkového obsahu fenolických zlúčenín .....	45
5.1.2	Stanovenie celkových flavonoidov .....	46
5.1.3	Stanovenie vybraných flavonoidov pomocou RP-HPLC/UV-VIS .....	48
5.1.4	Stanovenie celkových karotenoidov.....	49
5.1.5	UV-VIS spektrálna analýza.....	50
5.1.6	Stanovenie antioxidačnej aktivity .....	50
5.2	Interakcia bylinných extraktov s probiotikami .....	52
5.3	Vplyv rastlinných extraktov na viabilitu probiotík v priebehu modelového trávenia .....	54
5.4	Testovanie cytotoxicity vybraných extraktov s využitím bunkovej línie CaCo-2.....	58
5.4.1	MTT test.....	59
5.5	Enkapsulácia vybraných extraktov a probiotík.....	61
5.5.1	Stanovenie počtu probiotík v zmesiach určených k enkapsulácii .....	62
5.5.2	Účinnosť enkapsulácie .....	63
5.5.3	Analýza enkapsulovaných častíc pri prechode modelovou tráviacou sústavou.....	64
6	ZÁVER .....	66
7	ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV .....	68
8	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK .....	91
9	PRÍLOHY .....	93

# 1 ÚVOD

Vďaka masívnej industrializácii v poľnohospodárstve a potravinárskom priemysle získala moderná spoločnosť ľahší prístup k potravinám, prekonala hladomor a došlo k zásadným zmenám stravovacích návykov. Okrem toho sa častejšie zasahuje do normálneho osídľovania ľudského tela mikrobiotou lekárskymi zákrokmi ako napr. cisársky rez, nadmerným užívaním antibiotík, prehnanou osobnou hygienou, častým používaním dezinfekčných prostriedkov a pod. Celkovo je možné považovať moderný životný štýl za viac sedavý a hektický, pričom sú ľudia častejšie vystavovaní dlhodobému stresu. Tieto zmeny sú považované za hlavné faktory prispievajúce k nárastu chronických, metabolických a imunologických ochorení súčasnej spoločnosti. Podieľajú sa okrem iného na narušení črevnej mikrobioty a indukciu tzv. dysbiózy. Jedná sa o nerovnováhu v zložení mikrobioty gastrointestinálneho traktu, najmä zredukovanie prospešných kmeňov. Toto chudobnejšie zloženie črevnej mikroflóry je typické najmä pre ekonomicky rozvinutejšie moderné zeme a preto si vyslúžilo prezývku „západná mikrobiota“. Spája sa s ochoreniami ako diabetes mellitus 2. typu, metabolický syndróm, kardiovaskulárne ochorenia či zápalové ochorenia čriev, ale i mnoho ďalších na prvý pohľad nesúvisiacich problémov ako astma, alergie, obezita, rôzne autoimunitné a nádorové ochorenia, či dokonca autizmus.

Črevná mikrobiota bola ešte donedávna pomerne prehliadanou a podceňovanou súčasťou ľudského organizmu. Je pestrou zmesou rôznych mikroorganizmov, ktorých pomer a druhové zastúpenie sa líšia v závislosti na hostiteľovi a pôsobení rôznych exogénnych vplyvov.

Hoci ešte stále ostávajú niektoré presné imunologické mechanizmy prepojenia mikrobioty s imunitným systémom záhadou, nedá sa poprieť jej významný vplyv na celkový zdravotný stav. Ovplyvňuje množstvo procesov od vstrebávania potravy a živín, cez behaviorálne a emočné zmeny, až po odpovede organizmu na stresové podnety a imunitné odpovede. Rovnováha v zložení črevnej mikrobioty je veľmi dôležitým aspektom v udržaní celkovej homeostázy organizmu.

Chronický zápal v tele vedie k mnohým degeneratívnym ochoreniam. V poslednej dobe sa výrazne zvýšila prevalencia chronických črevných zápalov značne narúšajúcich kvalitu života. Ich vznik je úzko spätý s mnohými faktormi, avšak k tým najsignifikantnejším patrí práve črevná dysbióza. K liečbe zápalov sa všeobecne štandardne využívajú nesteroidné antiflogistiká. Ich užívanie má ale pomerne tienistú stránku množstva závažných nežiadúcich účinkov a kontraindikácií. Je preto snaha vyvinúť rôzne alternatívne postupy liečby týchto ochorení. Jedná sa najmä o zmenu stravovacích návykov a podporou prospešných kmeňov črevnej mikroflóry, ďalej príjem probiotík a prebiotík v prírodnej forme alebo ako výživových doplnkov, a pod. V ľudovej medicíne sa využívajú niektoré rastliny a byliny, vykazujúce minimálne či nulové vedľajšie účinky. Napríklad fenolické zlúčeniny vďaka svojim značným protizápalovým vlastnostiam už pritiahli záujem mnohých výskumných skupín.

Táto práca si kladie za cieľ navrhnúť vhodný výživový probiotický preparát obohatený o prírodné protizápalovo pôsobiace látky, ktorý by mohol pôsobiť ako prevencia či podpora obnovy správne fungujúcej črevnej mikroflóry, ako jedného zo základných stavebných kameňov celkového zdravia organizmu. Pri preukázaní jeho efektivity by mohol byť použitý ako výživový doplnok pri liečbe či predĺžení remisnej fázy u zápalových ochorení čriev napr. ľahších foriem Crohnovej choroby. Tieto bioaktívne zlúčeniny a probiotiká sú však nestabilné v prítomnosti mnohých faktorov ako svetlo, množstvo kyslíka a elektrolytov, a zároveň citlivé na zmeny pH a teploty prostredia. Jednou z efektívnych možností ochrany pred týmito nežiadúcimi vplyvmi prostredia je využitie enkapsulačných techník. Preto sa ďalej práca zameriava na navrhnutie vhodného enkapsulačného nosiča, prípravu častíc obsahujúcich požadované látky a probiotiká, stanovenie ich stability a v neposlednom rade testovanie ich prípadnej toxicity na ľudské epiteliálne črevné bunky.



## 2 TEORETICKÁ ČASŤ

### 2.1 Ľudská mikrobiota

Niekoľko posledných dekád sa výskum mikrobioty zameriaval predovšetkým na patogénne baktérie. Avšak v poslednej dobe rapídne stúpa počet štúdií preukazujúcich pozitívny význam komenzálnych baktérií osídľujúcich telá cicavcov vrátane človeka. Mikroorganizmy kolonizujú prakticky všetky telesné časti vystavené vonkajšiemu prostrediu. Zmes mikroorganizmov koexistujúcich s telom hostiteľa sa nazýva normálna alebo rezidentná mikroflóra. Okrem iného predstavuje biologickú obranu proti patogénnej tranzitnej, resp. prechodnej mikroflóre. Najväčší podiel mikroorganizmov sa nachádza v tráviacej sústave a samotné hrubé črevo obsahuje viac ako 70 % celkového množstva telesnej mikrobioty.<sup>1</sup> Dôvodom je nielen obrovský povrch čreva, ale aj výskyt a produkcia látok prospešných pre mikroorganizmy.

Veľmi pozoruhodný v porovnaní s inými spoločenstvami baktérií v našom tele a na jeho povrchu je najmä vzťah medzi mikróbmami v čreve a imunitným systémom. Mikróby v črevách môžu spustiť lokálnu imunitnú reakciu v rámci hrubého čreva, čím môžu ovplyvniť priebeh trávenia. Pokiaľ nie sú interakcie medzi imunitným systémom a črevnými mikróbmami optimálne, dochádza k negatívnemu dopadu na zdravie v rámci celého organizmu. Môže tak dôjsť napríklad k autoimunitným reakciám, pri ktorých T-lymfocyty a ďalšie zložky imunitného systému zasiahnu proti vlastným bunkám organizmu. Na závažnosť priebehu autoimunitnej reakcie vplýva okrem iného aj zastúpenie určitých typov baktérií v hrubom čreve.<sup>2,3</sup>

Črevné baktérie ďalej môžu ovplyvniť náladu, správanie a priebeh niektorých neurologických stavov na základe osy mozog–črevá.<sup>4-6</sup> To môže byť taktiež dôležitým faktorom pri liečbe alebo prevencii rôznych ochorení. Príkladom je pozorovanie zmeny hladiny mozgového neurotrofického faktoru (BDNF) v hipokampe po transplantácii mikrobioty. BDNF je proteín, ktorého abnormálna činnosť súvisí s rozvojom ochorení ako depresia, schizofrénia a obsedantno-kompulzívna porucha.<sup>7</sup> Črevná mikrobiota ďalej výrazne ovplyvňuje hladinu neurotransmiterov, napr. serotonínu.<sup>8</sup> Okrem toho bola preukázaná súvislosť medzi mikrobiotou a obezitou, čo má tiež vplyv na celkový zdravotný stav.<sup>9-11</sup>

Medzi typické priaznivé efekty zdravej črevnej mikrobioty patrí udržiavanie celkovej homeostázy organizmu; ochrana pred infekčnými patogénmi; dozrievanie a úprava imunitného systému; prevencia alergií a autoimunitných ochorení<sup>12</sup>; vývin tráviaceho systému a jeho vaskularizácie; posilnenie bariérovej funkcie sliznice v tráviacom trakte; produkcia živín a vitamínov; degradácia xenobiótík (lieky, toxíny, alkohol, toxické zložky stravy, potravinové aditíva a pod.); prevencia určitých nádorových ochorení; vplyv na formovanie a funkcie nervového systému<sup>13-15</sup>; vývoj psychomotorických funkcií; zdravie kože atď.<sup>16</sup>

#### 2.1.1 Epifytická flóra tráviacej sústavy človeka

Gastrointestinálny trakt predstavuje prostredie s najpočetnejšou a najpestrejšou mikrobiotou ľudského tela. Každý úsek je charakteristický svojím mikrobiálnym zastúpením. Početnosť jednotlivých populácií a druhov mikroorganizmov závisí predovšetkým od výživy, ďalej od veku človeka, zdravotného stavu, ale tiež na zemepisnej šírke a klíme. Pozdĺž tráviaceho traktu sa mení nielen zloženie, ale aj počet mikróbov v prepočte na mililiter obsahu (obrázok 1).<sup>17</sup>

##### 2.1.1.1 Ústna dutina

Dutina ústna je vhodným prostredím pre mikroorganizmy vzhľadom na dostatočné množstvo živín i pestrosť štruktúr osídľiteľných mikroorganizmami. Nachádza sa tu  $10^3$ – $10^7$  bakt./ml obsahu. Rozvoj mikrobiálneho zastúpenia je ovplyvnené predovšetkým dentíciou; u dieťaťa pred dentíciou je mikroflóra veľmi chudobná, s postupujúcou dentíciou sa mení zastúpenie a kvantita mikroorganizmov. Prítomné sú potom ako aeróbne, tak i anaeróbne druhy; napr. mikrokoky, stafylokoky, streptokoky (*Streptococcus*

*salivari*), gramnegatívne koky (*Neisseria*, *Veilonella*), ďalej zástupcovia rodov *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Spirillum*, *Actinomycetes israeli*, mykoplazmy ako *M. salivarius* a *M. orale*, vzácné *Clostridium*.

Prekvapujúcu prítomnosť anaeróbov vysvetľuje metabolická aktivita fakultatívnych anaeróbov, tvoriaca vhodné podmienky aj pre anaeróbne druhy. Väčšina mikroorganizmov v ústach nie je patogénna, ale pri oslabení organizmu a poškodení sliznice môžu preniknúť do tkanív a spôsobiť rôzne ochorenia, príp. sa môžu podieľať na vzniku zubných kazov.<sup>18–20</sup>

#### 2.1.1.2 Žalúdok

V tejto časti tráviacej sústavy je mikrobiota najchudobnejšia, pretože nízke pH (okolo 2) predstavuje prirodzenú bariéru proti kontaminácii nežiadúcou mikroflórou, čiže sa tu vyskytuje len približne  $10\text{--}10^5$  bakt./ml obsahu. Na stenách žalúdka sú prítomné acidotolerantné laktobacily, streptokoky a v menšej miere taktiež kvasinky. Okrem nich je možné niekedy detegovať mikroaerofilný *Helicobacter pylori*, ktorý je za určitých podmienok považovaný za pôvodcu žalúdočných vredov.<sup>21</sup>

#### 2.1.1.3 Tenké črevo

Proximálnu časť tenkého čreva tvorí malé zastúpenie mikroorganizmov, približne  $10^3$  bakt./ ml obsahu. Jedná sa o zástupcov rodov *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bacteroides* a ďalej napr. *Candida albicans*. Distálna časť sa svojou flórou podobá na hrubé črevo a počet mikrobov je približne  $10^8$  na ml obsahu.<sup>21</sup>

#### 2.1.1.4 Hrubé črevo

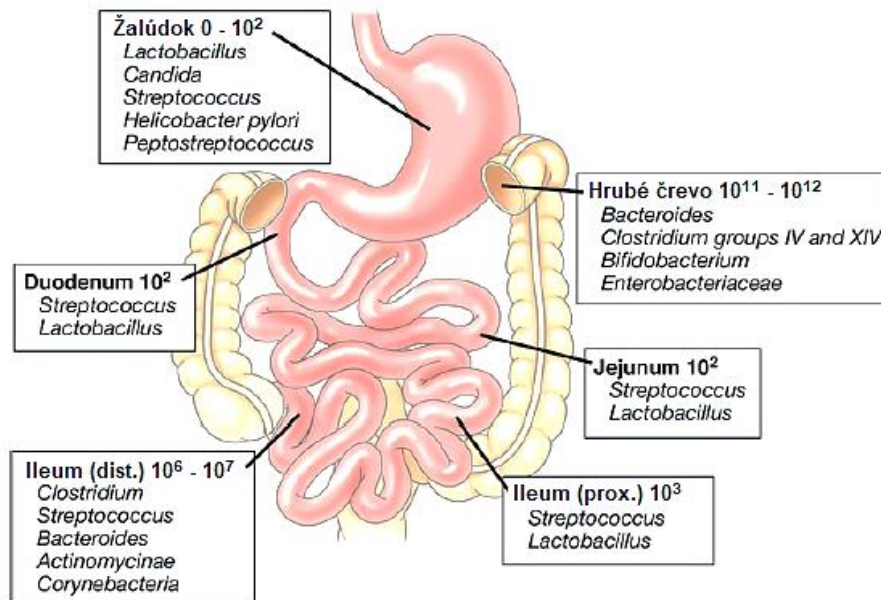
Väčšinu mikrobioty v hrubom čreve tvoria striktné anaeróby.<sup>22</sup> Na 1 ml obsahu pripadá cca miliarda ( $10^{12}$ ) mikrobov. Môžu byť adherované v ochrannom hliene alebo voľne umiestnené v lumen čreva. V hrubom čreve sú dominantné predovšetkým dva bakteriálne kmene – *Bacteroidetes* a *Firmicutes* (kde dominujú triedy *Clostridia* a *Bacilli*). Ďalej je však v tejto časti možné nájsť aj kmene *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Actinomicrobia*, *Fusobacteria* a *Cyanobacteria*.<sup>21, 23</sup>

Podľa zloženia črevnej mikrobioty boli definované dva ľudské enterotypy; *Bacteroides* a *Prevotella*. Pokiaľ je strava bohatá na komplexné sacharidy a vlákninu, je tak podporený rast prevotel. Prevalencia bielkovín a nasýtených tukov podporuje rast bakteroidných baktérií. Enterotyp *Prevotella* podporuje ochranu pred chronickým zápalom, degeneráciou a predčasným starnutím.<sup>24</sup>

Dôležitá zložka črevného biosystému ovplyvňujúca rozmiestnenie a osud mikrobioty je črevný hlien produkovaný pohárikovitými bunkami. Skladá sa predovšetkým z glykoproteínov, resp. mucínov, a látok exkretovaných ďalšími bunkami sliznice (enterocyty, Panethove bunky, leukocyty), čo sú napr. defenzíny, rezistíny, imunoglobulíny, lyzozým a interleukíny. Najvýznamnejšou funkciou hlienu je ochrana sliznice pred tráviacimi šťavami, mechanickým poškodením tráveninou a priamym kontaktom s mikrobiotou, ďalej umožňuje vzájomnú komunikáciu medzi bunkami sliznice, baktériami, bielymi krvinkami a črevným nervovým systémom, ale aj vzájomnú komunikáciu medzi samotnými baktériami. Po narušení vrstvy hlienu sa mikroby dostávajú do priameho kontaktu so sliznicou a bielymi krvinkami, objavuje sa zápal sliznice. Sliznica následne stráca funkciu bariéry a do krvi sú prepustené aj toxické a nežiaduce látky vylučované za normálnych podmienok preč z organizmu.

Hlien obsahuje niekoľko vrstiev. Prvá vrstva hlienu nasadá na sliznicu a glykokalyx, má hrúbku 10 až 40  $\mu\text{m}$ . Je pevne pripojená k sliznici a neobsahuje žiadne baktérie. Nachádza sa iba v hrubom čreve a žalúdku. Druhá vrstva je s prvou voľne spojená, má hrúbku 100 až 500  $\mu\text{m}$  a obsahuje adherované baktérie (*Clostridium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*). Sú tam prispôbené vhodné podmienky pre život komenzálnych baktérií – nie sú proti nim vytvárané protilátky a hlien obsahuje cukry ako výživu v časoch nedostatočnej exogénnej výživy.<sup>21, 25</sup> Mikroby prilepené v hliene zohrávajú rolu v ochrane pred patogénnymi baktériami (napr. produkciou určitých baktériocínov), ďalej podporujú regeneráciu hlienu (pri nedostatočnej exogénnej výžive ho však môžu vážne narušiť), komunikujú s leukocytmi, podporujú sekrečnú aktivitu buniek v sliznici (produkciu enzýmov, hormónov, mucínov, atď.). Za normálnych okolností sa žiadna z týchto baktérií nedostane cez sliznicu do krvi.<sup>26</sup>

Medzi mikróby žijúce voľne v črevnom obsahu patria baktérie rodov *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* a *Ruminococcus*.<sup>27</sup> Analýza druhov adherovaných v hliene je náročná, preto sa väčšina štúdií mikrobiotického zloženia opiera o informácie zo zloženia luminálnych populácií a je obťažné zistiť presnú skladbu črevnej mikrobioty.



Obr. 1: Zastúpenie a množstvo (počet baktérií na 1 ml obsahu) hlavných mikrobiálnych rodov v GIT<sup>28</sup>

### 2.1.2 Látky produkované črevnou mikrobiotou

Jednou z najdôležitejších vlastností črevnej mikrobioty je produkcia rôznych látok priamo i nepriamo ovplyvňujúcich zdravotný stav nositeľa. Vznikajú rôznymi mechanizmami, ale k najvýznamnejším patrí mikrobiálna fermentácia špecifických substrátov za anaeróbných podmienok.<sup>29</sup> Tú podstupujú najmä nestráviteľné polysacharidy, oligosacharidy, glykoproteíny a v menšej miere taktiež proteíny, peptidy a aminokyseliny. Je tak vďaka mikrobiote možné využiť energiu aj z tých zložiek potravy, ktoré sú v tenkom čreve nestráviteľné.<sup>30</sup> Niektoré chemické produkty sú podobné telu vlastným chemickým prenášačom a stávajú sa tak biologicky aktívnymi látkami. V tabuľke 1 sú zhrnuté známe látky produkované črevnou mikrobiotou.

Sacharolytické baktérie nachádzajúce sa prevažne v proximálnej časti hrubého čreva dokážu za anaeróbných podmienok fermentovať sacharidové substráty za vzniku lineárnych mastných kyselín s krátkym reťazcom (SCFA) obsahujúcich 1 až 6 atómov uhlíku, laktátu, oxidu uhličitého a vodíku. Proteolytická fermentácia je lokalizovaná skôr v distálnej časti, kde sú sacharidové substráty už vyčerpané. Fermentácia proteínov však nepredstavuje tak prospešný efekt pre zdravie konzumenta a je skôr nežiadúca, pretože okrem BCFA, oxidu uhličitého, metánu a vodíku dochádza i k produkcii potenciálne toxických metabolitov, konkrétne amoniaku, sulfánu, indolu a fenolu.<sup>29-34</sup> Na ľudských subjektoch sa však ich toxicita ešte stále testuje.<sup>35</sup>

Dostupnosť živín je hlavným kritériom ovplyvňujúcim pomer sacharolytickej a proteolytickej fermentácie. Množstvo degradačných metabolitov pochádzajúcich z proteolytického metabolizmu môže byť zredukované vyšším príjmom mikrobiotou využiteľných sacharidov (nerozpustných škrobov) a prebiotických oligosacharidov.<sup>36,37</sup> Okrem stravy však na zloženie črevnej mikrobioty a produkované látky vplyva mnoho faktorov ako napr. genetické predispozície hostiteľa, rýchlosť prechodu substrátov tráviacou sústavou, imunologické faktory a vplyvy prostredia vrátane príjmu rôznych xenobiótík, antibiotík, atď.<sup>38-40</sup>

Tab. 1: Prehľad bakteriálnych metabolitov, ktoré je možné nájsť v črevách<sup>34</sup>

Zdroj látok	Typ metabolitov
<b>Primárny bakteriálny metabolizmus</b>	Konečné produkty fermentácie sacharidov
	SCFA (acetát, propionát, butyrát, valerát) mastné kyseliny s dlhým reťazcom BCFA (izobutykrát, 2-metylbutyrát, izovalerát)
	Medziprodukty fermentácie sacharidov
	čiasťočne rozštiepené oligosacharidy komplexné proteoglykány z mucínov alkoholy
	Plynné metabolity
	fermentačné plyny (vodík, metán, oxid uhličitéy) prechavé látky (sulfán)
	Metabolity biokonverzie mastných kyselín a lipidov
	aldehydy s dlhým reťazcom mastné kyseliny
	Produkty fermentácie proteínov
	BCFA amoniak, amíny aromatické deriváty (fenoly, krezoly, indoly, atď.)
<b>Biokonverzia sekundárnych rastlinných metabolitov</b>	Produkty biokonverzie lignínov a fenolov equol, enterolaktón, atď.
<b>Látky z cytosólu baktérií alebo ich sekundárneho metabolizmu</b>	Vitamíny a kofaktory (vo veľmi nízkych koncentráciách)
	Peptidy (quorum-sensing signály u G <sup>+</sup> baktérií)
	Homoserín-laktóny (quorum-sensing signály u G <sup>-</sup> bakt.)
	Nukleové kyseliny
	Bakteriocíny
<b>Metabolity enterohepatickej cirkulácie</b>	Žľčovú kyseliny
	Cholesterol, koprostanol
	Hormóny a ich deriváty
	Glukuronidové konjugáty
<b>Enzýmy</b>	Reduktázy
	Glukuronidázy
	Glykohydrolázy
<b>Komponenty bakteriálnej bunkovej steny</b>	Lipopolysacharid A
	Látky odvodené od peptidoglykánu
	Glykokalyx a polysacharidy bakteriálnych kapsúl

### 2.1.2.1 SCFA

Medzi najvýznamnejšie SCFA patrí acetát, propionát a butyrát, prípadne v menšom množstve valerát. Tieto tri hlavné SCFA patria k tomu najdôležitejšiemu, čo baktérie v črevách produkujú. Všeobecne je v najväčšom množstevnom pomere vytváraný acetát, ale za biologicky najvýznamnejší sa dá považovať butyrát. Množstvo vyprodukovaných SCFA závisí na zložení mikrobioty (tabuľka 2), na substráte podliehajúcom fermentácii a jeho rýchlosti prechodu črevom. Presné množstvo vyprodukovaných SCFA je však veľmi náročné stanoviť, keďže väčšina sa veľmi rýchlo vstrebáva do tela a do stolice sa dostane menej ako 5 % z celkového množstva.<sup>29, 30, 34</sup>

SCFA všeobecne okrem iného podporujú rast sacharolytických baktérií najmä laktobacilov a bifidobaktérií vďaka ich potenciálu znižovať pH produkciou organických kyselín v lumen čreva, ktoré patogénnym baktériám (hlavne gramnegatívnym) nevyhovuje a naopak je vhodné pre prospešné kmene. Zohrávajú tak významnú rolu vo fyziológii hrubého čreva.<sup>33, 41, 42</sup>

Tab. 2: Prehľad hlavných bakteriálnych rodov produkujúcich dané SCFA<sup>30</sup>

Acetát	<i>Bacteroides, Bifidobacterium, Eubacterium, Lactobacillus, Clostridium, Ruminococcus, Peptostreptococcus, Propionibacterium, Veillonella, Fusobacterium, Butyrivibrio, Peptococcus, Streptococcus, Enterobacter, Atopobium, Enterococcus</i>
Propionát	<i>Bacteroides, Propionibacterium, Veillonella, Clostridium, Prevotella, Porphyromonas, Megasphaera</i>
Butyrát	<i>Roseburia, Faecalibacterium (Faecalibacterium prausnitzii), Clostridium (Clostridium butyricum, C. kluyveri, C. Pasterianum), Eubacterium (Eubacterium rectale), Fusobacterium (Fusobacterium nucleatum), Peptostreptococcus, Butyrivibrio (Butyrivibrio fibrisolvens), Peptococcus</i>

Acetát a propionát prestupujú bazolaterálnou membránou črevných epiteliálnych buniek a cez portálnu žilu sa dostávajú do pečene. Acetát ďalej môže vstúpiť do syntézy cholesterolu alebo sa metabolizuje v iných tkanivách ako možný zdroj energie pre svaly, mozog, srdce a obličky.<sup>30</sup> V mozgu dokáže prestúpiť cez hematoencefalickú bariéru a znížiť pocit hladu. Acetát je hlavnou SCFA detekovateľnou v krvi, čo je možné využiť pri sledovaní udalostí prebiehajúcich v čreve. Propionát v pečeni vstupuje do glukoneogenézy, prípadne sa podieľa na inhibícii syntézy cholesterolu.<sup>29, 30, 32–34, 43</sup>

Butyrát je absorbovaný epiteliálnymi bunkami sliznice hrubého čreva. Služi im ako zdroj energie a regulátor bunkovej proliferácie a diferenciácie.<sup>29, 30</sup> Zohráva ďalej dôležitú rolu v udržiavaní črevnej homeostázy a integrity mukóznej sliznice, vykazuje protinádorový a protizápalový potenciál, ovplyvňuje črevnú bariéru, stimuluje antioxidantné procesy a ovplyvňuje pocit sýtosti.<sup>31, 43</sup>

Zaujímavé sú *in vitro* a *in vivo* štúdie preukazujúce úlohu butyrátu v ovplyvňovaní imunitnej odpovede. Pokiaľ je v hrubom čreve menej butyrátu, znamená to zvýšené riziko chronického zápalu a následne i rakoviny hrubého čreva. V prípade kolorektálneho karcinómu bolo až štvornásobne znížené množstvo producentov butyrátu *Faecalibacterium prausnitzii* a *Eubacterium rectale*.<sup>44</sup>

Butyrát patrí medzi histónové deacetylázové inhibítory (HDACi). Najčastejšie skúmaným protizápalovým účinkom butyrátu je potlačenie aktivácie nukleárneho faktoru NF- $\kappa$ B (kapitola 2.1.3), čo môže byť práve výsledkom inhibície histónových deacetyláz.<sup>29–32</sup>

Ďalším protizápalovým mechanizmom je inhibícia produkcie interferónu  $\gamma$  a zvýšenie počtu receptorov aktivovaných proliferátormi peroxizómov (PPAR $\gamma$ ). Sú to jadrové receptory nachádzajúce sa v cytoplazme buniek. Po naviazaní ligandu celý komplex putuje do jadra bunky, dôjde k väzbe na DNA a je tak ovplyvnená transkripcia rôznych génov. Tento transkripčný faktor je vysoko exprimovaný v epiteliálnych bunkách a jeho aktivácia má protizápalové dopady.<sup>29–31</sup>

Tretím možným protizápalovým procesom je pôsobenie butyrátu ako signálnej molekuly pre receptory spojené s G-proteínom. Receptory GPR41 a GPR43 sú exprimované na imunitných bunkách a takisto vo veľkom množstve prítomné v sliznici hrubého čreva. Predpokladá sa, že tieto receptory zohrávajú rolu v imunitnej kontrole pri interakciách sliznice s baktériami.<sup>30–32</sup>

### 2.1.2.2 Laktát a sukcinát

Laktát a sukcinát sú medziproduktmi fermentácie sacharidov. Za fyziologických podmienok sú metabolizované ďalej na acetát, propionát alebo butyrát. Nedochoádza teda k ich hromadeniu v lumen čreva. Nedávne štúdie však označili sukcinát ako prozápalový signál, ktorý môže vyvolať ulcerózne zápalové procesy v črevách.<sup>45, 46</sup>

Laktát je produkovaný komenzálnymi baktériami vo forme D-laktátového izoméru. U pacientov trpiacich IBD, črevnou ischémiou, syndrómom skráteneho čreva a apendicitídou boli zistené v krvnej plazme a moči zvýšené hladiny D-laktátu. To poukazuje na dysbiózu spojenú so zvýšenou črevnou priepustnosťou. Laktát je dôležitý kosubstrát mnohých sulfát-redukujúcich baktérií, preto môže jeho nadmerne zvýšená hladina prispieť k nežiadúcej dysbióze zvýhodňujúcej práve tento typ baktérií. Vo vzorkách stolice pacientov s IBD boli objavené vyššie množstvá laktátu, ktorý je pravdepodobne produkovaný bunkami črevnej sliznice.<sup>47-51</sup>

#### **2.1.2.3 Antimikrobiálne pôsobiace látky**

Grampozitívne baktérie, napr. *Lactococcus lactis* sú schopné produkovať peptidické antibiotiká, tzv. lantibiotiká, obsahujúce nezvyčajnú polycyklickú tio-éterovú aminokyselinu lantionín. Táto látka narúša bunkovú stenu aj u multirezistentných patogénnych kmeňov.

Medzi nelantibiotické bakteriocíny patria napr. malé antimikrobiálne peptidy produkované laktobacilmi (*L. plantarum*, *L. acidophilus* NCFM, *L. johnsonii* NCC 533 a *L. sakei*). Tieto látky majú pomerne široké spektrum účinku a sú toxické najmä voči grampozitívnym rodom ako *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Listeria* a *Mycobacteria*. Mechanizmus účinku spočíva vo vytvorení pórov v cytoplazmatickej membráne citlivých baktérií alebo v narušení esenciálnych enzýmov. U bifidobaktérií boli navyše objavené bakteriocíny efektívne proti grampozitívnym aj gramnegatívnym patogénom.<sup>52-54</sup>

#### **2.1.2.4 Neurotransmitery a vitamíny produkované mikrobiotou**

Črevná mikrobiota dokáže produkovať rôzne neurohormóny a neurotransmitery ako napr. sérotonín, melatonín,  $\gamma$ -aminomaslová kyselina (GABA), katecholamíny, histamín, acetylcholín a pod. Všetky tieto látky sa podieľajú na komunikácii črevnej mikrobioty, ale môžu sa dostať aj mimo GIT a ovplyvniť rôzne časti organizmu, predovšetkým však mozgové funkcie.<sup>16, 55, 56</sup>

Niektorí zástupcovia črevnej mikrobioty u ľudí dokážu syntetizovať vitamín K ( $K_2$  menachinón) známy svojimi antikoagulačnými účinkami a väčšinu vitamínov skupiny B (konkrétne tiamín, riboflavín, niacín, pantoténová kyselina, pyridoxín, biotín, folát, kobalamín). Narozdiel od vitamínov prijímaných v strave absorbovaných v proximálnej časti tenkého čreva sú tieto vitamíny produkované mikróbmami absorbované až v hrubom čreve.<sup>57, 58</sup>

#### **2.1.2.5 Toxické látky produkované mikrobiotou**

Okrem zdraviu prospešných produktov metabolizmu komenzálnych baktérií existujú aj toxické metabolity, ktoré sú za normálnych podmienok odbúravané v pečeni a obličkách. Pri zlyhaní funkcie pečene však môžu tieto látky vyvolať kognitívne problémy, označované ako pečenná encefalopatia.<sup>59</sup>

Jedným z najpreskúmanejších toxických produktov mikrobioty je trimetylamín-N-oxid (TMAO). Táto molekula vzniká z lecitínu a karnitínu, vyskytujúcich sa najmä v červenom mäse, mikrobiálnou premenou na trimetylamín (TMA) ako prekursoru TMAO. Množstvo vyprodukovaného TMAO závisí na zložení mikrobioty a stravovacích návykoch.<sup>60, 61</sup>

Toxických produktov bakteriálneho metabolizmu je oveľa viac a vznikajú predovšetkým v distálnej časti hrubého čreva pri fermentácii proteínových substrátov. U zdravých jedincov sa zvyčajne tieto produkty ako fenolické zlúčeniny, *p*-krezol a indol v tele nehromadia, ale sú z tela odstránené.<sup>37</sup>

Baktérie redukujúce sulfáty využívajú vodík ako donor elektrónu a sulfát ako oxidačné činidlo pre rozklad organickej hmoty za vzniku sulfánu. Toxický potenciál sulfánu v črevách spočíva najmä v jeho vplyve na oxidatívny metabolizmus črevných epiteliálnych buniek, kde inhibuje aktivitu cytochróm-oxidáz. Tie katalyzujú redukciu kyslíka na vodu. Sulfán pravdepodobne zohráva rolu aj v etiológii ulceróznej kolitídy.<sup>62-64</sup> *In vitro* experimenty taktiež preukázali, že sulfán môže vyvolať poškodenie DNA v črevných bunkách.<sup>65</sup> Na druhú stranu sa sulfán preukázal ako dôležitá signálna molekula. K poškodeniu buniek narušením oxidačnej kapacity sulfánom dochádza až pri nedostatočnej schopnosti epiteliálnych buniek ho zmetabolizovať.<sup>66</sup>

Ďalšou potenciálne toxickou látkou je amoniak. Črevný epitel je pri bakteriálnej degradácii neabsorbovaných a endogénnych dusíkatých zlúčenín neustále vystavovaný milimolárnym koncentraciám amoniaku. Vyššie koncentrácie amoniaku sa však spájajú s narušenou syntézou nukleových kyselín a zmenami v morfológii, funkcii a životnosti črevných buniek.<sup>67, 68</sup> Nadmerná koncentrácia amoniaku v črevách sa spája okrem iného s poruchami autistického spektra u detí.<sup>69</sup>

### 2.1.3 Chronický zápal

Zápal je biologická reakcia vyvolaná narušením homeostázy v tkanivách pôsobením určitého biologického, chemického alebo fyzikálneho faktoru.<sup>70</sup> Medzi tieto faktory môžu patriť rôzne patogény (baktérie, plesne a vírusy), poškodenie tkanív, toxické chemikálie a reakcie imunitného systému (hypersenzitivita).<sup>71</sup> Zápal môže byť akútny alebo chronický v závislosti na type stimulu a schopnosti imunitného systému opraviť poškodené tkanivo. Akútny zápal nastupuje rýchlo rádovo v priebehu minút a trvá niekoľko hodín až dní. Je sprevádzaný výpotkom tekutín a plazmových proteínov, a migráciou leukocytov, prevažne neutrofilov. Akonáhle imunitný systém úspešne eliminuje škodlivé reagens, celá reakcia vymizne. Pokiaľ sa nepodariť ich úplne zlikvidovať, môže to vyústiť do chronickej fázy. Chronický zápal spôsobuje dlhodobú nadmernú prítomnosť lymfocytov, makrofágov, angiogénu, fibrózu a poškodenie daného tkaniva.<sup>72</sup>

Počas zápalu sa môžu makrofágy aktivovať rozpoznávaním patogénnych endotoxínov, lipopolysacharidov, peptidoglykánov alebo flagelínu pomocou nástrojov vrodenej imunity (PRR), konkrétne napr. toll-like receptorov (TLR).<sup>73</sup> TLR patria k transmembránovým receptorom nachádzajúcim sa na povrchu buniek, ktoré sa dostávajú do styku s mikróbmi alebo ich produktmi. Každý TLR rozpoznáva skupinu MAMP alebo PAMP produkovanú symbiotickými alebo patogénnymi baktériami. PAMP-TLR interakcia podmienuje signálnu dráhu uvoľňujúcu NF- $\kappa$ B. Jedná sa o transkripčný faktor, ktorý je zodpovedný za aktiváciu génov spojených s transkripciou zápalových mediátorov ako sú interleukíny, napr. (IL)-1 $\beta$ , IL-6, IL-8; prozápalové chemokíny, rastové faktory, tumor nekrotizujúci faktor (TNF)- $\alpha$  a prostaglandíny, ďalej adhézne molekuly, zápalové enzýmy ako indukovateľná NO-syntáza zodpovedná za vznik oxidu dusnatého a cyklooxygenázy. Táto signálna dráha taktiež zvyšuje produkciu reaktívnych kyslíkových druhov (ROS) a vedie k odstráneniu mikroorganizmov vyhodnotených ako patogény.<sup>72, 74–76</sup>

Druhou dôležitou skupinou patriacou medzi PRR sú tzv. NOD-like receptory (NLR). Narozdiel od TLR sa nachádzajú v cytosóle enterocytov a sú schopné rozpoznať časti bakteriálnych bunkových stien, ktoré prenikli do vnútra buniek. Slúžia podobne ako TLR k udržiavaniu črevnej homeostázy a v prípade výskytu patogénnych častíc sú schopné spustiť zápalový proces spojený s aktiváciou NF- $\kappa$ B vedúci k produkcii prozápalových látok.<sup>73, 77–81</sup>

Dlhodobo zvýšená produkcia týchto molekúl pri chronickom zápale sa spája so sklonmi ku chronickým degeneratívnym ochoreniam ako je artritída, ateroskleróza, astma, Alzheimerova choroba, nádorové ochorenia a pod.<sup>76, 82</sup> K spomaleniu zápalového procesu sa používajú v klinickej praxi nesteroidné antiflogistiká (NSAID). Ich užívanie však sprevádza množstvo vedľajších účinkov ako sú gastrointestinálne poruchy, zadržiavanie vody v tele, zlyhanie obličiek, bronchospazmus a hypersenzitivita. Je preto snaha nahradiť ich efektívnymi alternatívami vykazujúcimi menej nežiadúcich účinkov.<sup>83, 84</sup>

### 2.1.4 Idiopatické zápaly čriev

Slizničný epitel hrubého čreva je neustále v kontakte s látkami z vonkajšieho prostredia, mikroorganizmami a ich produktmi. Enterocyty preto musia neustále monitorovať potenciálnu hrozbu a adekvátne imunologicky reagovať. Tento pohotovostný stav sa nazýva fyziologický kontrolovaný nízkestupňový zápal. Pri chronických zápalových stavoch sa predpokladá neschopnosť organizmu tolerovať tento fyziologický zápal na základe poruchy v imunitnej kontrole.<sup>29, 31, 32</sup>

Presný etiologický mechanizmus nie je známy, ale predpokladá sa súhra dedičných faktorov a pôsobenia spúšťačov, ktorými môžu byť stres, lieky, nesprávna životospráva, fajčenie, vírusová infekcia, poškodenie bariérovej funkcie čreva, narušenie črevnej mikroflóry a abnormálna imunitná reakcia na komenzálne črevné baktérie.<sup>85-87</sup> Medzi genetické faktory patrí predovšetkým narušenie vrodenej imunity (napr. abnormálna expresia génov produkujúcich mucíny, mutácie génov zapojených do rozpoznávania baktérií, génov súvisiacich s T-lymfocytovou imunitou, génov pre TLR)<sup>87</sup>, autofágie a fagocytózy.<sup>88-90</sup> Dysfunkčné interakcie medzi TLR v črevných epiteliálnych bunkách a komenzálnymi baktériami vedú k zápalom čreva. Prozápalová odpoveď vedúca k narušeniu sliznice môže spôsobiť dysbiózu, ktorá vedie späť k intenzívnejšiemu narušeniu sliznice.<sup>91-93</sup>

Dysbióza, resp. mikrobiálna nerovnováha, je spoločným javom u ľudí trpiacich ochoreniami ako je Crohnova choroba, metabolický syndróm, rakovina hrubého čreva, a dokonca i autizmus.<sup>28, 94</sup> Okrem toho vedie k atopickým ekzémom<sup>95, 96</sup> či aktivácii HIV infekcie.<sup>97</sup> Je ťažké nájsť ochorenie, ktoré by nebolo spojené s odchýlkami v mikrobiote. Pokiaľ dôjde k nerovnováhe v črevnej mikrobiote, môžu byť signály z hrubého čreva nesprávne interpretované imunitným systémom, a to môže vyvolať autoimunitné reakcie, pri ktorých T-lymfocyty a ďalšie bunky imunitného systému zasiahnu proti vlastným zložkám organizmu. Nie je však také podstatné aké baktérie sa nachádzajú v črevách, ale skôr záleží na látkach, ktoré produkujú. Podporením baktérií produkujúcich SCFA je možné regulovať T-lymfocyty a utlmiť zápal.<sup>98, 99</sup>

Niekoľko štúdií na ľudských subjektoch potvrdilo, že k dysbióze môže dôjsť po užívaní antibiotík.<sup>100-102</sup> Tieto štúdie poukazujú najmä na riziká zbytočného užívania antibiotík, ktoré môže viesť k podporeniu oportunistických patogénov v črevách (napr. *Clostridium difficile*)<sup>103</sup> a rozvoju mnohých komplikácií ako napr. hnačka spojená s užívaním antibiotík<sup>104</sup>, zvýšené riziko salmonelózy<sup>105</sup> či pre-rastenie rodu *Enterococci*.<sup>106</sup>

Ďalším spúšťačom dysbiózy je pôsobenie dlhodobého stresu. Stresové faktory podnecujú vylúčenie množstva hormónov a neurotransmiterov ovplyvňujúcich telesné reakcie ako napr. zvýšenie tepovej frekvencie, uvoľnenie zásob energie k poháňaniu svalov a zmeny gastrointestinálnej motility. Zmeny črevnej motility tak môžu prispieť k dysbióze zvýhodňujúcej určitý patogén.<sup>107</sup>

Bola snaha zistiť, či za vznikom IBD stojí konkrétny patogén, ale doposiaľ sa nepotvrdilo, že by šlo o jediného patogénneho zástupcu. Predpokladá sa, že u pacientov s IBD došlo k narušeniu imunitnej odpovede na endogénne bakteriálne druhy vyskytujúce sa prirodzene v GIT a tiež navýšenie nežiadúcich druhov (tabuľka 3).<sup>93, 107, 108</sup> V prípade biopsií ilea sa u pacientov s Crohnovou chorobou objavil opakovane zvýšený výskyt patogénnej adherentno-invazívnej formy *E. coli*.<sup>28, 107</sup> Všeobecne bol v porovnaní so zdravými jedincami pozorovaný nadmerný výskyt čeľade *Enterobacteriaceae* a naopak znížený výskyt baktérie *Faecalibacterium prausnitzii*. Bolo pozorované menšie zastúpenie druhov produkujúcich butyrát.<sup>109, 110</sup> Stále však nie je jasné, či je tento jav príčina alebo následok zápalového ochorenia. Sú však reálne obe možnosti; kolitidogénne baktérie sa môžu premnožiť z dôvodu zapálenej sliznice a zároveň môžu podporiť ďalšie patofyziologické procesy v črevách.<sup>111-113</sup>

Tab. 3: Dysbióza medzi baktériami chrániacimi črevo a baktériami podporujúcimi rozvoj IBD<sup>114</sup>

Protektívne baktérie	Baktérie podporujúce IBD
<i>Bifidobacterium spp.</i>	Vybrané druhy <i>Bacteroides spp.</i>
<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Saccharomyces boulardii</i>	<i>Fusobacterium spp.</i>
<i>Clostridium butyricum</i>	Črevný <i>Helicobacter spp.</i>
<i>E. coli</i> Nissle 1917	Entero-invazívna forma <i>E.coli</i>
<i>Ruminococci</i>	<i>Eubacterium spp.</i>
	<i>Peptostreptococcus spp.</i>



Z imunologického hľadiska je IBD (obzvlášť Crohnova choroba) spustená činnosťou T-lymfocytov produkujúcich zápalové cytokíny (TNF, IFN $\gamma$ ). Avšak novšie štúdie preukázali spojitosť kolitíd s pomocnými T-bunkami (pri Crohnovej chorobe T<sub>H1</sub> a T<sub>H17</sub>), ktoré produkujú zápalové cytokíny (IL-17) a vyžadujú IL-23 pre ich fungovanie. Tieto zápalové odpovede sú vyvažované špecializovanými regulátorovými T-bunkami (T<sub>reg</sub>). Mechanizmus, ktorým T<sub>reg</sub> bunky potláčajú zápal, zahŕňa expresiu protizápalových cytokínov (napr. IL-10), transformačného rastového faktoru  $\beta$  (TGF $\beta$ ) a IL-35; rozpad bunkového metabolizmu pomocou expície receptoru IL-2; cytolýzu; a podporu dozrievania dendritických buniek.<sup>115</sup>

Oxidatívny stres (bližšie popísaný v kapitole 2.4.1) sa môže taktiež významne podieľať na vzniku či iniciácii IBD. ROS sú úzko späté s progresiou IBD. U pacientov s IBD bola zistená výrazne znížená celková antioxidačná aktivita.<sup>116, 117</sup>

Pôsobenie zápalových faktorov odštartuje kaskádu zápalových ochorení čriev, počnúc zápalom vedúcim k ulcerácii a fibróze, pokračujúcu až k nádorovým ochoreniam.<sup>82</sup>

Crohnova choroba a ulcerózna kolitída sa považujú za tzv. nešpecifické zápalové črevné ochorenia (IBD). Najčastejšie sa objavujú vo veku 15 až 30 rokov, výnimočne medzi 50. a 70. rokom života.<sup>118</sup> Prevalencia IBD sa rapídne zvýšila od polovice 20. storočia najmä v Európe a Severnej Amerike a štátoch, kde sa uchytil tzv. západný životný štýl, pre ktorý je typický výskyt „západnej mikrobioty“.<sup>119</sup> Symptómy IBD zahŕňajú chronické striedanie fázy remisie a relapsu spojeného so zápalom a ulceráciou sliznice gastrointestinálneho traktu. Medzi histopatologické prejavy IBD patrí strata bariérovej integrity v črevnej stene, indukcia zápalových cytokínov a inducibilnej NO-syntázy, lézie v črevnom epiteli a vláknité zjazvenie.<sup>120, 121</sup> K symptómom sprevádzajúcim tieto ochorenia patrí napr. hnačka spojená s výraznou stratou hmotnosti, bolesti a kŕče v brušnej oblasti, krvácanie z tráviaceho traktu a ulceratívne obštrukcie. V niektorých prípadoch dochádza k výskytu príznakov aj v iných častiach tela a môžu sa objaviť problémy napr. s pečeňou, kožou, očami či kĺbmi. Hoci sú si obe ochorenia patriace pod IBD podobné, každé má svoje špecifiká. Crohnova choroba narozdiel od ulceratívnej kolitídy môže zasiahnuť akúkoľvek časť tráviacej sústavy a klinické prejavy sa potom i regionálne líšia. Ulceratívna kolitída zasahuje výhradne oblasť hrubého čreva a rekta.<sup>118, 122</sup>

V aktívnej fáze Crohnovej choroby hrozí riziko podvýživy, výrazného úbytku na hmotnosti, a nedostatku proteínov a ďalších živín. Dôvodom je anorexia spôsobená zvýšenou hladinou zápalových cytokínov, obštrukcia čriev, bolesti brucha a strach z kŕčov a hnačky po konzumácii stravy. Nedostatok mikro- a makroprvkov vo výžive je častým javom pri Crohnovej chorobe a je zapríčinený zápalovými procesmi, obmedzeniami pri výbere potravín, stratami živín a ich nedostatočným vstrebávaním (pri chronickej hnačke), a v neposlednom rade liekovými interakciami. Medzi živiny, ktorých nedostatok je najviac markantný patria vitamíny A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>9</sub>, B<sub>12</sub>, D, E; ďalej železo, vápnik, horčík, draslík a zinok.<sup>123-126</sup> Symptómy IBD výrazne ovplyvňuje strava a stres, preto životný štýl a zmena výživy môže značne pomôcť pri liečbe tohto ochorenia.

## 2.2 Probiotiká

Probiotiká sú definované ako preparáty obsahujúce životaschopné a definovateľné mikroorganizmy vo vhodnom počte, ktoré pokiaľ sú podané v adekvátnom množstve, dokážu pozmeniť črevnú mikroflóru a tým vyvolať priaznivý zdravotný efekt u daného konzumenta. Za účinné množstvo sa považuje aspoň 10<sup>6</sup> životaschopných buniek v grame výrobku.<sup>127, 128</sup>

Aby dané mikroorganizmy mohli byť považované za probiotiká, musia spĺňať niekoľko kritérií:

- 1) musia byť schopné prežiť pôsobenie žalúdočnej kyseliny, žlčových a pankreatických štiav, aby sa dostali do tenkého a hrubého čreva;
- 2) nesmú byť patogénne alebo toxické pre daný organizmus;
- 3) musia ostať živé počas transportu a skladovania;
- 4) musia vykazovať prospešný efekt na hostiteľský organizmus;
- 5) mali by stabilizovať črevnú mikroflóru;
- 6) mali by byť schopné prilnúť k bunkám črevného epiteliu;
- 7) mali by produkovať antimikrobiálne látky pôsobiace proti patogénnym mikroorganizmom.<sup>128, 129</sup>

Prežitie bakteriálneho kmeňa v danom finálnom prípravku závisí na faktoroch ako výsledné pH produktu, prítomnosť iných mikroorganizmov, teplota skladovania, prítomnosť alebo absencia mikrobiálnych inhibítorov v substráte. Pri príprave probiotických potravín je tiež treba zohľadniť produkciu zápachov a chutí danými kmeňmi. Využívajú sa rôzne formy ako tablety, kapsle, roztoky či probiotikami fortifikované potraviny.<sup>130, 131</sup>

V Česku je používanie probiotík vymedzené Vyhláškou č. 446/2004 Sb., ktorou sa stanovujú požiadavky na doplnky stravy a na obohacovanie potravín doplnkami stravy.<sup>132</sup>

### 2.2.1 Pozitívne vplyvy probiotík na organizmus

Súčasným probiotickým prípravkom ovplyvňujú procesy v hrubom čreve predovšetkým nepriamo. Pôsobia na anaeróbne baktérie, žijúce v hrubom čreve, metabolizujú im prospešné látky, prispievajú k udržiavaniu optimálneho pH, podporujú ich rast, komunikujú so sliznicou hrubého čreva (napr. využitím TLR a MAMP), črevným nervovým systémom a s bielymi krvinkami. Podnecujú enterocyty, aby produkovali defenzíny pôsobiace proti patogénnym baktériám, vírusom a hubám. Probiotiká ďalej prispievajú k zlepšeniu trávenia, absorpcii živín, minerálov a vitamínov, a spevneniu bariérovej funkcie stien čriev. Nedokážu sa však v tráviacej sústave dlhodobo udržať. Okrem prispievania k celkovému zdraviu je známych aj niekoľko probiotických kmeňov, ktoré sú účinné pri konkrétnych diagnózach. V klinickej praxi je dôležité odhadnúť správne dávkovanie.<sup>128, 133, 134</sup> Zhrnutie preukázaných zdravotných benefitov užívania probiotík sa nachádza v tabuľke 4.

Tab. 4: Pôsobenie probiotík na zdravotné komplikácie u ľudských subjektov<sup>135</sup>

Cieľový jav	Predpokladaný mechanizmus účinku
Alergie (atopický ekzém, alergia na mlieko, reumatická artritída) <sup>134, 136–141</sup>	Translokácia/bariérový efekt
Endotoxémia spojená s alkoholovou poruchou pečene <sup>142</sup>	Potlačenie črevnej mikrobioty produkujúcej endotoxíny
<i>Helicobacter pylori</i> <sup>143</sup>	Aktivita inhibujúca premnoženie patogénov
Hnačka (spojená s užívaním antibiotík, spôsobená rotavírusom, <i>C. difficile</i> , cestovateľská, komunitná) <sup>144, 145</sup>	Kolonizačná rezistencia, translokácia/bariérový efekt, zvýšenie imunitnej odpovede
Hypertenzia <sup>146</sup>	Časti baktérií alebo peptidy vyprodukované fermentáciou slúžiace ako inhibítory ACE
IBD <sup>28, 107, 147–150</sup>	Zníženie zápalovej imunitnej odpovede, stimulácia produkcie protizápalových cytokínov (IL-10 a TGF-β)
IBS symptómy (zápcha, nepatogénna forma hnačky, meteorizmus, flatulencia, kŕče, halitóza) <sup>151</sup>	Zmena zloženia a aktivity črevnej mikrobioty
Imunomodulácia (imunitný status, odpoveď imunity na vakcináciu) <sup>152, 153</sup>	Interakcia s imunitnými bunkami alebo bunkovými receptormi vedúca k zvýšenej fagocytárnej aktivite bielych krviniek, zvýšenie hladiny sérového IgA po vystavení antigénu, zvýšená proliferácia lymfocytov v epitelochoch, regulácia rovnováhy medzi T <sub>H</sub> 1 a T <sub>H</sub> 2 bunkami, indukcia syntézy cytokínov

Tab. 4: Pôsobenie probiotík na zdravotné komplikácie u ľudských subjektov<sup>135</sup> - pokračovanie

Cieľový jav	Predpokladaný mechanizmus účinku
Karcinogenéza, mutagenita, tumory <sup>154-156</sup>	Absorpcia mutagénov, stimulácia imunity, inhibícia prokarcinogénnej črevnej mikrobioty
Laktózová intolerancia <sup>157, 158</sup>	Doplnenie bakteriálnej laktázy v tenkom čreve, premena laktózy na kyselinu mliečnu
Obličkové kamene <sup>159</sup>	Zmena črevnej mikrobioty ovplyvňujúcej degradáciu oxalátu
SIBO <sup>160</sup>	Kolonizačná rezistencia, antimikrobiálna aktivita
Tvorba zubných kazov <sup>161</sup>	Zmena zloženia, aktivity a schopnosti ústnej mikrobioty adherovať na zuby
Vaginóza, infekcie močového traktu <sup>162</sup>	Kolonizačná rezistencia, antipatogénna aktivita
Vysoká hladina cholesterolu <sup>69, 163</sup>	Dekonjugácia žlčových kyselín

### 2.2.1.1 Prevencia pred patogénnymi infekciami

Profylaktická schopnosť probiotík spočíva v kolonizačnej rezistencii a v tvorení antibakteriálne pôsobiacich látok inhibujúcich nežiaduce mikroorganizmy ako napr. organické kyseliny (acetát, propionát, butyrát, kyselina mliečna)<sup>164</sup>, bakteriocín<sup>165</sup>, peroxid vodíka atď. Tieto látky nielenže znižujú počet patogénov, ale dokonca majú vplyv aj na ich metabolizmus a produkciu toxínov.<sup>166, 167</sup>

Probiotiká sú ďalej schopné zablokovať väzbové miesta patogénov a taktiež využiť výživové zdroje skôr ako sa k nim dostanú patogénne druhy. Takto môžu zabrániť kolonizácii čreva a tvorbe biofilmu patogénov ako *Streptococcus mutans* či *Candida albicans*.<sup>168-171</sup> Príkladom je rýchlejšie využitie dihydrogénfosforečnanu vápenatého, glukózy, N-acetyl-glukozamínu a kyseliny sialovej v čreve skôr ako *Clostridium difficile*.<sup>166, 172</sup>

Dôležitou vlastnosťou probiotík je schopnosť indukovať špecifickú i nešpecifickú imunitu proti črevným infekciám. Dokážu ovplyvňovať reakcie imunity na niekoľkých úrovniach, napr. zvýšením hladiny cytokínov a imunoglobulínov, aktiváciou makrofágov, zvýšením aktivity „natural killer“ buniek atď.<sup>173</sup> Konkrétnym príkladom je zvýšenie imunitnej odpovede pri vírusovej hnačke pomocou *L. casei*<sup>174</sup>. U predčasne narodených detí bolo preukázané minimalizovanie rizika vzniku nekrotizujúcej enterokolitídy.<sup>133</sup>

Zaujímavou vlastnosťou objavenou u *S. boulardii* a *Bacillus clausii* je enzymatické odstránenie alebo zakrytie receptorov črevnej sliznice senzitívnych voči toxínom. Tento mechanizmus chráni pred infekciou *C. difficile*.<sup>175, 176</sup> Bola preukázaná aj schopnosť niektorých probiotických kmeňov (*B. longum* a *L. acidophilus*) inhibovať replikáciu častíc spôsobujúcich črevnú infekciu rotavírusom.<sup>177</sup>

### 2.2.1.2 Mechanizmy pôsobenia probiotík pri zápalových ochoreniach

Mnoho štúdií preukázalo, že probiotiká vyvolávajú produkciu protizápalových cytokínov ako IL-10 dendritickými bunkami. Pri podaní probiotického preparátu tzv. VSL #3 myšiam s kolitídou sa zvýšila produkcia IL-10 a TGFβ produkovaných T-bunkami.<sup>178</sup> *L. reuteri* a *L. casei* podmienili ľudské dendritické bunky k zvýšeniu hladiny T<sub>reg</sub> buniek a tým k produkcii IL-10. Probiotiká taktiež dokážu inhibovať produkciu zápalových cytokínov. Napr. *E. coli* Nissle1917 inhibuje vývin a expanziu periférnych T-lymfocytov, zvyšuje hladinu IL-10 a znižuje TNF, IFN-γ a IL-2, produkovaných týmito bunkami.<sup>179-183</sup>

Črevný epitel zohráva významnú rolu v udržovaní zdravého GIT. Narušenie slizničnej vrstvy je jedným z hlavných príznakov IBD. Probiotiká dokážu stimulovať odpovede črevných epiteliálnych buniek, vrátane obnovy porušenej slizničnej bariéry, produkcie ochranných proteínov a blokovania apoptických mechanizmov epiteliálnych buniek podmienených cytokínmi.<sup>184-190</sup> Ďalej sa predpokladá,

že manipulácia s mikrobiálnym zložením čriev v prospech prínosných rodov *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* by mohol byť vhodnou alternatívnou stratégiou pri liečbe a prevencii IBD. Sú pri tom využívané predovšetkým dva základné probiotické mechanizmy; produkcia antibakteriálnych látok a kompetitívna inhibícia príľnutia patogénov a ich toxínov na črevnú sliznicu.<sup>191–193</sup> Stále je však nedostatok relevantných štúdií, ktoré by jasne preukázali efektivitu probiotík pri terapii IBD.<sup>194</sup>

### 2.2.1.3 Psychobiotiká

Existuje zaujímavá skupina probiotických baktérií, tzv. psychobiotiká, ktoré produkujú psychoaktívne zlúčeniny pôsobiace v mozgu.<sup>195</sup> Koexistencia IBD a rôznych psychických porúch potvrdzuje prepojenie GIT s centrálnou nervovou sústavou na mnohých úrovniach. Medzi endokrinné faktory ovplyvňujúce „os mozog-črevá“ patrí okrem iných kortizol. Je produkovaný za stresových podmienok a môže podnietiť imunitné bunky k sekrécii zápalových cytokínov. Taktiež môže ovplyvniť zloženie mikrobioty v črevách. Spôsobená dysbióza môže zvýšiť produkciu určitých biologicky aktívnych zlúčenín, ktoré sa dostávajú pomocou krvného obehu až do mozgu. Tento proces vedie k narušeniu signalizačných dráh medzi mozgom a črevami a ústi do patofyziologických stavov.<sup>4, 196</sup>

Predbežné štúdie s psychobiotikami u ľudí začínajú mať sľubné výsledky čo sa týka zmiernenia symptómov chronického únavového syndrómu<sup>197</sup> a syndrómu dráždivého tračníka.<sup>198</sup> Probiotické baktérie v experimentoch na zvieracích modeloch preukázali priaznivé účinky aj na ďalšie aspekty súvisiace s nervovou sústavou. *Lactobacillus rhamnosus* a *johnsonii* a *Bifidobacterium* potláčajú úzkosť, napätie, stres z odlúčenia v experimente u myšíc mláďat. Znižujú koncentráciu kortizolu, zvyšujú hladinu GABA ako známeho trankvilizéru a podporujú stimuláciu parasimpatikového nervového systému. *L. helveticus* a *B. longum* sa podieľajú na zlepšení nálady a zmiernujú oslabovanie mentálnych funkcií vo vyššom veku.<sup>55, 199</sup>

### 2.2.2 Možné riziká pri užívaní probiotických prípravkov

Napriek zdravotným benefitom, ktoré sprevádzajú konzumáciu probiotík, sa nájde niekoľko nežiadúcich efektov ako je hnačka pri vysokých dávkach a sepsa u onkologických pacientov. Zatiaľ sa zdá, že u zdravých jedincov nevykazujú vedľajšie účinky. Avšak u citlivejších pacientov bola počas klinických testov zaznamenaná nadmerná imunitná odpoveď, škodlivá metabolická aktivita, transfer génov (najmä génov rezistencie voči antibiotikám) a vedľajšie účinky na gastrointestinálny trakt. U imunokompromitovaných pacientov bolo zistené invazívne ochorenie vyvolané baktériami *L. mesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus*, *L. plantarum*, *L. paracasei* spp. *paracasei* F19, LGG; *L. johnsonii* LA 1; VSL #3; *S. boulardii* (u pacientov s HIV) a *L. plantarum* 299V (u pacientov po transplantácii pečene).<sup>200–203</sup> U pacientov so syndrómom skráteného čreva sa v spojení s užívaním probiotík objavila D-laktátová acidóza.<sup>204, 205</sup>

Potenciálnemu riziku septického stavu vyvolaného požívaním živých baktérií by mohlo zamedziť využitie probiotických supernatantov pre terapeutické účely. Niekoľko štúdií preukázalo ich efektivitu podobnú ako pri užívaní probiotík s eliminovaným rizikom septického šoku alebo nežiadúcich interakcií s mikrobiotou.<sup>206, 207</sup>

Vo všeobecnosti sa dá považovať užívanie probiotík za bezpečné a nežiadúce účinky sa objavujú len výnimočne. Je však treba zvýšiť opatrnosť u detí a imunokompromitovaných pacientov. Ďalší fakt, ktorý treba zohľadniť pri používaní probiotík je unikátna mikrobiota u každého človeka a preto sa nemusí jedna kombinácia probiotík preukázať rovnako účinná ako u iného človeka. Pre probiotiká neplatí model univerzálneho liečiva pre všetkých. Pokiaľ vyvoláva určitá kombinácia a forma probiotického prípravku bolestivé zažívacie problémy, znamená to, že nie je pre konkrétneho človeka vhodné a je treba hľadať iný produkt.

### 2.2.3 Najčastejšie využívané probiotické baktérie

Predpokladom pre výber konkrétnych kmeňov ako probiotík je využívanie daných baktérií dlhú dobu v priebehu histórie ľudstva bez spozorovania nežiadúcich či škodlivých účinkov. Doposiaľ najlepšie preštudované baktérie a ich potvrdený pozitívny vplyv na konzumenta pri zaimplementovaní do probiotických prípravkov je u druhov *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. plantarum* a *L. sake*), *Bifidobacterium longum*, *Enterococcus faecium* a *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Clostridium butyricum*, *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces cerevisiae* a niektorých ďalších.

V praxi sa potvrdil klinický význam predovšetkým rodov *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*.<sup>131, 208, 209</sup>

***Lactobacillus*** (Kmeň: *Firmicutes*; Trieda: *Bacilli*; Rad: *Lactobacillales*; Čeľaď: *Lactobacillaceae*; Rod: *Lactobacillus*)

Rod *Lactobacillus* patrí medzi nesporujúce grampozitívne pravidelné tyčinky usporiadané retiazkovo alebo do palisád. Sú fakultatívne anaeróbne alebo mikroaerofilné, chemoorganotrofné, náročné na výživu – vyžadujú určité cukry, aminokyseliny, peptidy, estery mastných kyselín, deriváty nukleových kyselín a vitamíny. S glukózou ako sacharidovým zdrojom energie môžu homofermentatívne druhy laktobacilov produkovať viac ako 85 % kyseliny mliečnej alebo v prípade heterofermentatívnych druhov kyselinu mliečnu, oxid uhličitý, etanol (a/alebo kyselinu octovú) v ekvimolárnych množstvách.<sup>210</sup> Optimálne podmienky pre ich rast sa líšia druhovo, ale optimálne pH sa pohybuje v rozmedzí 4,5–6,4 a teplota 15–45 °C.

Bežne sa vyskytujú v potravinách, v čistej aj znečistenej vode, sú súčasťou mikrobioty ústnej dutiny, GIT a vagíny. Využívajú sa pri výrobe fermentovaných potravín, príp. ako probiotiká. Za určitých okolností sa podieľajú na tvorbe zubného kazu.<sup>211</sup>

- *L. acidophilus* je homofermentatívny druh, vyskytuje sa prirodzene v ústach, črevnom trakte a vagíne, využíva sa k príprave fermentovaných mliečnych výrobkov.

- *L. casei* je heterofermentatívny druh, vyskytuje sa v ústach a v črevnom trakte, využíva sa pri výrobe mliečnych výrobkov, nápojov a pri výrobe čedaru. Živé baktérie *L. casei* sa preukázateľne podieľajú na potlačení špecifických kľúčových zápalových procesov pri zápale sliznice vyvolanom *E. coli* počas Crohnovej choroby.<sup>212</sup>

- *L. plantarum* patrí medzi heterofermentatívne druhy, využíva sa vo výrobe fermentovaných potravín, nakladanej zeleniny, pri siláži, výrobe syrov a probiotík. Produkuje bakteriocíny.

- *L. rhamnosus* bol považovaný pôvodne za poddruh *L. casei* a až genetické štúdie preukázali, že sa jedná o samostatný druh. Je to heterofermentatívny druh a nachádza sa prirodzene vo vagíne. Ako probiotikum sa využíva pri liečbe predovšetkým bakteriálnych vaginóz. Ďalej sa využíva pri výrobe jogurtov a mliečnych výrobkov.<sup>211</sup>

***Bifidobacterium*** (Kmeň: *Actinobacteria*; Trieda: *Actinobacteria*; Rad: *Bifidobacteriales*; Čeľaď: *Bifidobacteriaceae*; Rod: *Bifidobacterium*)

Baktérie rodu *Bifidobacterium* sú grampozitívne nepohyblivé tyčinky, usporiadané jednotlivo alebo vo dvojiciach do tvaru „V, Y“. Môžu tvoriť i palisády či retiazky. Sú striktne anaeróbne s fermentatívnym metabolizmom. Hlavnými metabolitmi sú kyselina mliečna a octová v pomere 2 : 3, v menšom množstve môže vznikáť etanol, sukcinát a mravenčan. Existujú však i druhy tolerujúce určité koncentrácie kyslíku, pokiaľ je prítomný oxid uhličitý a bifidogénne faktory. Optimálne pH sa pohybuje v rozmedzí 6,5–7 a teplotné optimum medzi 37–41 °C.

Prirodzene je ich možné nájsť v ústnej dutine a v črevnom trakte teplokrvných živočíchov vrátane človeka, u hmyzu alebo v odpadových vodách.

- *B. bifidum* sa nachádza v potravinách, vo fekáliách dojčiat a dospelých ľudí, vo vagíne, fekáliách kojáčich teliat, v klinickom materiáli. Využitie nachádzajú vo fermentovaných mliečnych výrobkoch alebo ako súčasť probiotických preparátov.

- *B. longum* sa vyskytuje v čreve a je antagonistom patogénnych črevných tyčínok. Využíva sa najmä ako probiotikum, ľahko sa viaže na črevnú stenu obzvlášť v prítomnosti inulínu alebo vlákniny ako prebiotík. Celkový počet sa môže znižovať s vekom človeka.<sup>211, 213</sup>

- *B. breve* sa nachádza vo fekáliách zdravých dojčiat kojených materským mliekom, v materskom mlieku a vo fekáliách dospelých. Vykazuje špecifické metabolické vlastnosti, ale jeho množstvo s vekom človeka rapídne klesá. Je to spôsobené najmä vysokou citlivosťou voči antibiotikám. *B. breve* má preukázateľné probiotické vlastnosti, využíva sa napr. u detí k liečbe zápchy a môže mať podporný charakter pri liečbe chronickej astmy.<sup>214, 215</sup>

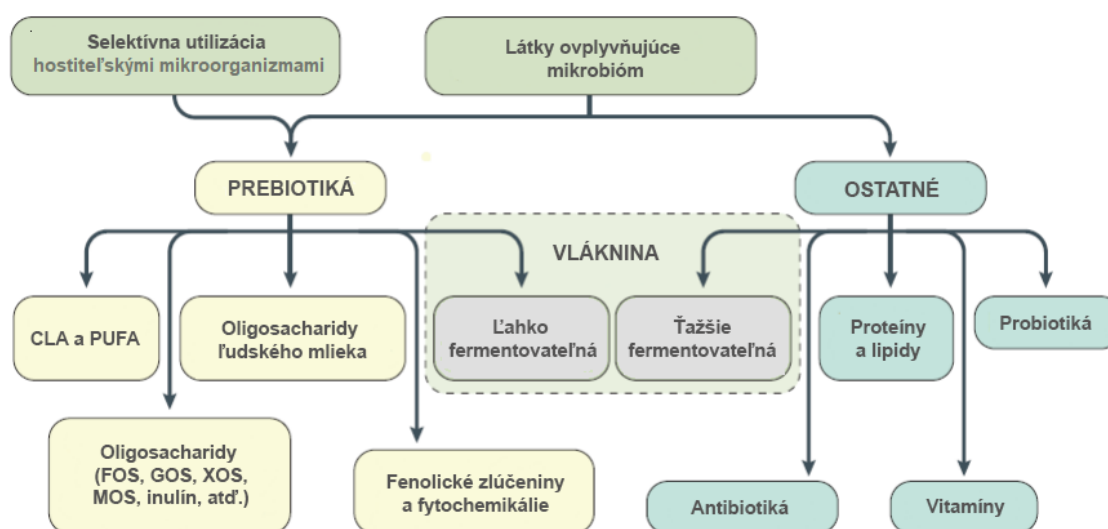
### 2.3 Prebiotiká a synbiotiká

Prebiotiká sú nestráviteľné oligosacharidy, definované ako substrát, ktorý je selektívne utilizovateľný hositeľskými mikroorganizmami a udeľujúci zdravotný benefit konzumentovi.<sup>209</sup>

Látka je možno považovať za prebiotiká, ak spĺňajú nasledujúce podmienky: 1) nemôžu byť hydrolyzované alebo absorbované v hornej časti gastrointestinálneho traktu; 2) sú selektívne skvasené limitovaným počtom prospešných črevných baktérií; 3) sú schopné pozmeniť črevnú mikroflóru v prospech jej zdravšieho zloženia.<sup>216</sup> Na prebiotické vlastnosti sacharidov zo štruktúrneho hľadiska vplývajú faktory ako monosacharidové zloženie (overené prebiotiká sú zložené hlavne z glukózy, galaktózy, xylózy a fruktózy), väzby medzi monosacharidovými zložkami predurčujúce stráviteľnosť a fermentačnú selektivitu, a v neposlednom rade molekulárna hmotnosť.<sup>217</sup>

Príjem prebiotík umožňuje v čreve udržiavanie prospešných bakteriálnych kmeňov, ktoré ich fermentujú a produkujú SCFA, čo vedie k regulácii a podpore trávenia a k homeostáze. Ďalej bola preukázaná spojitosť medzi prebiotickou liečbou a zvýšením aktivity črevných dendritických buniek exprimujúcich IL-10, TLR-2 a TLR-4.<sup>218</sup> Efekt prebiotík súvisí s pôvodnou skladbou mikrobioty jedinca pred užívaním prebiotík, hlavne množstvo bifidobaktérií. Prebiotiká stimulujú pôvodnú populáciu k rastu.<sup>219</sup> Zvýšený počet sa udržiava po celú dobu podávania prebiotík a k progresívnemu úbytku dochádza približne po 1-2 týždňoch po ukončení terapie.<sup>220</sup>

Medzi najčastejšie využívané prebiotiká, ktoré spĺňajú kritéria definície prebiotík z roku 2017 patria fruktooligosacharidy (hlavne inulín), galaktooligosacharidy a laktulóza. Časť vlákniny (napr. pektíny, celulóza, xylány) nie je možné nazývať prebiotikami, pretože podporuje rast širokého spektra mikroorganizmov, nielen tých podporujúcich zdravie konzumenta (obrázok 2).<sup>209</sup>



Obr. 2: Vymedzenie prebiotík na základe najnovšej definície, preložené<sup>209</sup> (CLA – konjugovaná kyselina linolová; PUFA – polynenasýtené mastné kyseliny; FOS – fruktooligosacharidy; GOS – galaktooligosacharidy; XOS – xylooligosacharidy; MOS – mannanooligosacharidy)

Synbiotiká sú kombináciou probiotík a prebiotík a ich synergický efekt by mal presahovať súčet účinkov jednotlivých častí. Táto kombinácia prispieva k predĺženiu prežitia probiotík, pre ktoré je prebiotikum špecifickým substrátom vhodným k fermentácii. Medzi najčastejšie patrí kombinácia bifidobaktérií a FOS; bifidobaktérií a GOS; a laktobacilov a laktulózy.

Synbiotiká zároveň znižujú hladinu nežiadúcich metabolitov, napr. nitrózoamínov, pre-karcinogénov a slúžia ako prevencia pred zápchou a hnačkou rôzneho pôvodu. Väčšina testovaných synbiotík navyše zlepšuje vstrebávanie vápnika, horčika a fosforu. Synbiotiká sa využívajú napr. pri ochoreniach pečene pre ich schopnosť znižovania hladiny cholesterolu a krvného tlaku. Význam synbiotík v terapii IBD však zatiaľ nie je dostatočne klinicky validovaný.<sup>220-223</sup>

## 2.4 Prírodné protizápalové látky

Normálna činnosť imunitného systému vyžaduje pravidelný príjem určitého množstva požadovaných živín.<sup>224</sup> Epidemiologické štúdie potvrdzujú, že stravovacie návyky veľmi ovplyvňujú zápalové procesy v organizme. Prílišné prejedanie sa, typické pre západný trend stravovania sa, prispieva k výskytu obezity a taktiež vedie k zvýšenej náchylnosti k zápalovým procesom organizmu a aktivácii nechcených častí imunitného systému. Avšak pri podvýžive, kedy nie je telu dodané dostatočné množstvo živín, predovšetkým vitamínov, minerálov a esenciálnych mastných kyselín, taktiež dochádza k imunosupresívnym reakciám a k zvýšenému riziku vzniku rôznych infekcií.<sup>225, 226</sup>

Existuje mnoho zložiek potravy, ktoré ovplyvňujú imunologické a zápalové procesy v tele. Jedná sa o samotný energetický príjem, ďalej o tuky, vitamíny, minerály, stopové prvky, alkohol, vlákninu, probiotiká a prebiotiká, a taktiež fytochemikálie. Vo všeobecnosti je zvýšený príjem ovocia, zeleniny a celozrnných obilnín spojený so zníženým rizikom zápalu.<sup>225</sup>

### 2.4.1 Fytochemikálie a imunitný systém

Fytochemikálie sú veľmi rozsiahla heterogénna skupina látok syntetizovaných v priebehu sekundárneho metabolizmu rastlín. Prijímaná dávka sa líši v závislosti na množstve požitej rastlinnej stravy a stupni jej úpravy. Medzi fytochemikálie, ktoré ovplyvňujú imunitný systém, patria flavonoidy, fenolické látky, sulfidy, saponíny a fytoestrogény. Protizápalové účinky vykazujú karotenoidy, flavonoidy, fenolové kyseliny, monoterpény a sulfidy (tabuľka 5).<sup>225</sup>

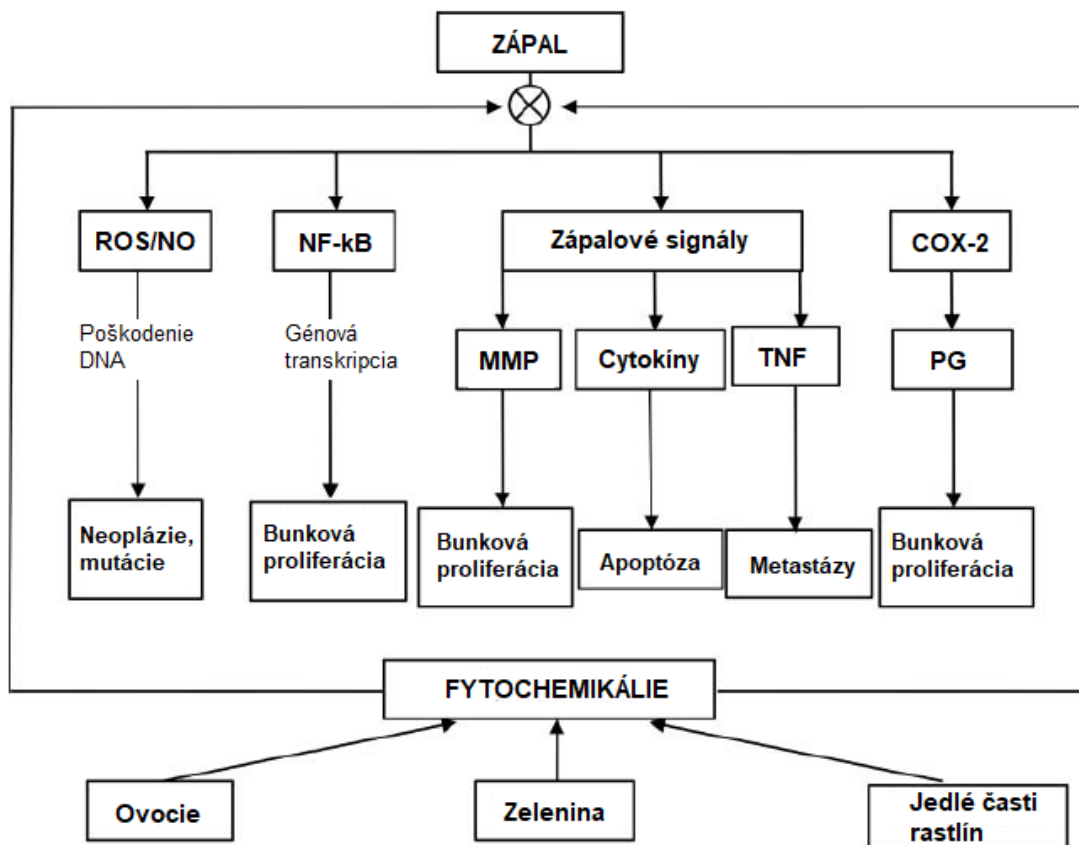
Tab. 5: Fyziologické efekty fytochemikálií<sup>225</sup>

	Karotenoidy	Fytosteroly	Saponíny	Glukozinoláty	Flavonoidy	Fenolové kyseliny	Inhibítory proteáz	Monoterpény	Fytoestrogény	Sulfidy	Kyselina fytová
Protirakovinové	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Antimikrobiálne			■	■	■	■		■		■	
Antioxidačné	■				■	■	■		■	■	■
Antitrombické					■					■	
Imunomodulačné	■		■		■	■			■	■	■
Protizápalové	■				■	■			■	■	■
Ovplyvňujúce krvný tlak					■					■	
Znižujúce cholesterol	■	■	■	■	■			■		■	
Ovplyvňujúce hladinu glukózy v krvi					■	■	■				■

Fytochemikálie zmiernujú zápalové procesy pomocou kináz (napr. proteín-kináza C, mitogénmi aktivovaná proteín-kináza). Fitochémikálie inhibujú aktivitu týchto enzýmov zmenením schopnosti transkripčných faktorov (NF-κB) viazať sa na DNA a indukovať zápalovú dráhu. To vedie k inhibícii produkcie zápalových mediátorov ako zápalové cytokíny (IL-1β, IL-6, TNF-α), vedúcich k chronic-kému zápalu.

Oxid dusnatý (NO) je ďalší zo spúšťačov zápalu. Fitochémikálie môžu zredukovať syntézu NO pomocou indukovateľnej NO-syntázy bez narušenia činnosti endotelovej alebo nervovej NOS. Analogicky dokážu ovplyvniť aj enzým cyklooxygenázu-2 (COX-2). Schematické zhrnutie týchto procesov je naznačené na obrázku 3.

Ďalšou funkciou fitochémikálií je zníženie hladiny uvoľňovaného histamínu, čo zmiernuje alergické reakcie.<sup>227-229</sup>



Obr. 3: Prepojenie medzi protizápalovo pôsobiacimi fitochémikáliami a zápalovými procesmi<sup>230</sup>

#### 2.4.1.1 Antioxidačne pôsobiace fitochémikálie

Množstvo fitochémikálií vykazuje významný antioxidačný efekt, čo sa tiež podieľa na prevencii vzniku zápalov. V aeróbných bunkách vznikajú ako medziprodukt normálnej mitochondriálnej aktivity reaktívne formy kyslíka (ROS). ROS vznikajú počas určitých redoxných reakcií a počas neúplnej redukcie kyslíka alebo oxidácie vody v mitochondriách a chloroplastoch v priebehu dýchacieho reťazca. Okrem prirodzených metabolických procesov sa k endogénnym zdrojom ROS radí i zápal. Medzi exogénne zdroje patrí ionizujúce žiarenie, patogénne infekcie, rádiomimeticky pôsobiace látky a okolité bunky tvoriace ROS.

Voľné radikály sú atómy, ióny alebo molekuly obsahujúce vo svojom valenčnom orbitále jeden, príp. viac nepárových elektrónov. Pokiaľ nie sú tieto nepárové elektróny konjugované s ďalšími valenčnými elektrónmi, voľný radikál je značne nestabilný a chemicky vysoko reaktívny. Voľné



radikály ľahko postupujú redoxnú reakciu s inými atómami či molekulami, čím sa sami stabilizujú.

Vznik singletového kyslíka ( $^1\text{O}_2$ ) podmieňuje produkciu ďalších ROS ako sú napr. peroxid vodíka ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), superoxidový anión ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), hydroxylový ( $\text{HO}^\bullet$ ) a perhydroxylový ( $\text{O}_2\text{H}^\bullet$ ) radikál. Superoxidové anióny sú taktiež produkované v chloroplastoch, keď sú elektróny prenášané priamo z „Fotosystému I“ na kyslík. Tieto reaktívne molekuly, najmä  $\text{HO}^\bullet$ , majú vysoko deštruktívne účinky na lipidy, proteíny a nukleové kyseliny.

Oxidatívny stres je výsledkom chemickej nerovnováhy medzi antioxidantami a voľnými radikálmi. Za normálnych podmienok sú voľné radikály odstránené ochrannými antioxidačnými mechanizmami, avšak pri patofyziologickom stave môžu byť produkované v nadmernom množstve.<sup>231</sup> Nadmerná produkcia môže vyvolať somatické mutácie vedúce až k neoplastickým transformáciám.<sup>231, 232</sup> Vysoká úroveň voľných radikálov sa u ľudí spája s vyšším výskytom degeneratívnych problémov ako sú chronické zápal, nádorové a kardiovaskulárne ochorenia, diabetes, artritída, mozgová dysfunkcia, Alzheimerova a Parkinsonova choroba atď.<sup>231, 233–237</sup>

Pri izolácii a štúdiu antioxidantov je vhodné sa zamerať na rastliny prirodzene vystavené vysokej miere oxidatívneho stresu, pretože sa počas svojho fylogenetického vývoja museli prispôbiť a vytvoriť si kvalitný ochranný systém s vyššou koncentráciou antioxidačných látok.<sup>238</sup> Systémy využívajú neenzymatické a enzymatické formy antioxidantov, resp. antiradikálovo pôsobiacich látok, líšiac sa svojím zložením v závislosti od danej bunkovej časti. Tieto látky podporujú terminačný krok v reťazovej radikálovej reakcii, aby nevznikali žiadne ďalšie radikálové produkty. Týmto spôsobom sa dá predísť oxidácii lipidov a iných biomolekúl, pretože dochádza k presunu vodíka v záujme neutralizácie voľných radikálov.

Najväčšiu skupinu rastlinných antioxidantov tvoria antioxidačné vitamíny ako kyselina askorbová,  $\alpha$ -tokoferol a karotenoidy; antioxidačné enzýmy – hlavne redukovaný glutatión, a ďalej flavonoidy a polyamíny.<sup>238, 239</sup>

#### **2.4.1.2 Protizápalovo pôsobiace mastné kyseliny**

Dôležitou zložkou potravy inhibujúcou zápalové dráhy sú tiež nenasýtené mastné kyseliny. Omega-6-mastné kyseliny pôsobia prozápalovo, zatiaľ čo omega-3 mastné kyseliny vykazujú protizápalové účinky potlačením interleukínu IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  a IL-6.<sup>240, 241</sup> Protizápalová aktivita  $\omega$ -3 mastných kyselín zahŕňa zníženie produkcie leukotriénu B<sub>4</sub>, tromboxanu A<sub>2</sub>, prostaglandínu E<sub>2</sub>, ďalej inhibíciu zápalových cytokínov (IL-1), TNF a zhasanie voľných radikálov. Boli preto navrhnuté pri liečbe IBD ako prevencia fáz vzplanutia, aj keď klinické testy zatiaľ dostatočne nepreukázali ich schopnosť predĺžiť remisnú fázu u Crohnovej choroby.<sup>242–244</sup>

#### **2.4.2 Fenolické zlúčeniny**

Fenolické zlúčeniny majú podobný mechanizmus účinku ako NSAID – znižujú činnosť myeloidných buniek (najmä makrofágov). S tým je spojená nižšia expresia iNOS, COX-2, zápalových cytokínov IL-1 $\beta$ , TNF, IL-6 a ďalších zápalových markerov inhibíciou ich aktivity alebo génovej expresie. Ich protizápalové vlastnosti súvisia so špecifickou polyfenolickou štruktúrou.<sup>245–247</sup> Zo štruktúrneho hľadiska obsahujú aspoň jeden aromatický kruh substituovaný hydroxylovými skupinami. Fenolické štruktúry sú často esterifikované a metylované. Je ich možné nájsť v dimerizovanom alebo polymerizovanom stave.<sup>238</sup>

Antioxidačné účinky vykazujú inhibíciou enzýmov (konkrétne napr. xantinoxidázy, proteínkinázy C) podieľajúcich sa pri vzniku superoxidového anión radikálu. Niektoré fenolické látky dokážu tvoriť komplexy s kovmi vyskytujúcimi sa pri tvorbe reaktívnych foriem kyslíku (najmä Cu a Fe<sup>2+</sup>). Sú ľahko oxidovateľné, schopné redukovať voľné radikály a zabrániť im zreagovať s nejakou bunkovou časťou. Medzi fenolickými zlúčeninami však existujú aj tzv. prooxidanty, z ktorých vznikajú voľné radikály.<sup>238</sup>

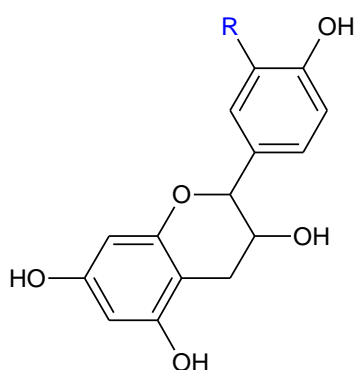
Fenolické látky sú po požití ľudským organizmom rozpoznávané ako xenobiotiká, čo predznamenáva ich zníženie biologickú dostupnosť. Ich štruktúrna zložitosť a stupeň polymerizácie ovplyvňuje,

či sa dokážu vstrebať už v tenkom čreve alebo putujú v tráviacom trakte ďalej. V tenkom čreve sa ľahko absorbujú fenolické látky s nízkou molekulárnou hmotnosťou a fenoly vo forme aglykónov. Následne sú konjugované, presunuté do pečene a spolu so žľou sa vracajú naspäť do tenkého čreva. Do hrubého čreva doputujú v nezmenenej podobe oligoméne, glykozylované a polymérne štruktúry (napr. kondenzované taníny) a môžu byť spracované lokálnou mikrobiotou.<sup>248–250</sup>

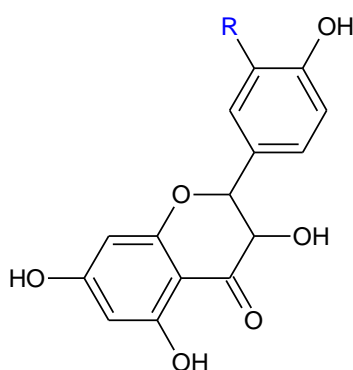
Fenolické zlúčeniny je možné všeobecne rozdeliť na flavonoidné a neflavonoidné molekuly, ktoré sa ďalej rozdeľujú na fenolové kyseliny, stilbény a lignány.

### 2.4.2.1 Flavonoidy

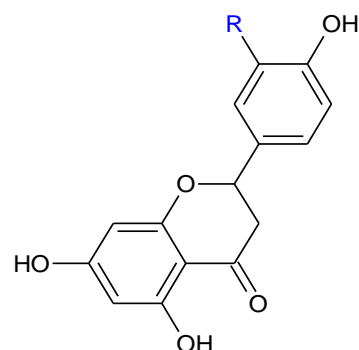
S viac ako 5 000 rôznymi druhmi tvoria flavonoidy obrovskú skupinu fenolických zlúčenín. Podľa stupňa oxidácie pyranóзовého cyklu sa flavonoidy ďalej rozdeľujú na flavanoly (obrázok 4), flavonoly (obrázok 5), flavanóny (obrázok 6), proantokyandíny – polymérne flavanoly antokyandíny (obrázok 7), flavóny (obrázok 8) a izoflavonoidy (obrázok 9). Všeobecné štruktúry boli vytvorené v programe ChemSketch.



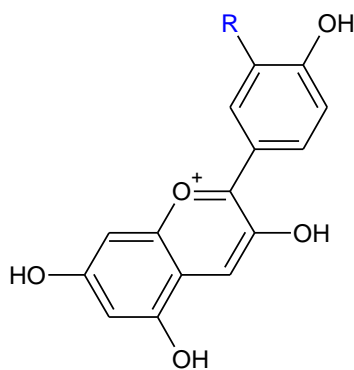
Obr. 4: Schéma flavanolov



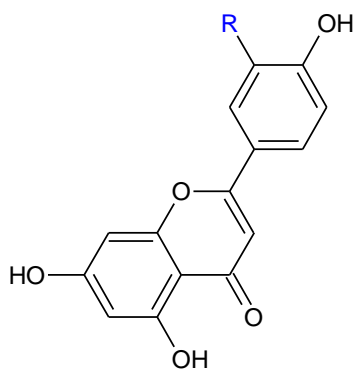
Obr. 5: Schéma flavonolov



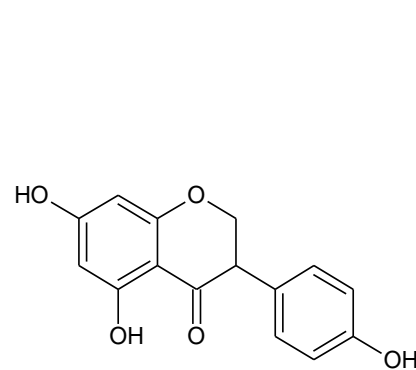
Obr. 6: Schéma flavanónov



Obr. 7: Schéma antokyandínov



Obr. 8: Schéma flavónov



Obr. 9: Schéma izoflavonoidov

Flavonoidy sa nachádzajú vo väčšine rastlinných pletív, najmä vo vakuolách ako monoméry, diméry a vyššie oligoméry. Často slúžia ako rastlinné farbivá lákajúce opel'ovačov. Medzi tieto farbivá patria červené antokyány (ich aglykonová časť sa označuje ako antokyandín); pelargonidíny a delfinidíny. Ďalšie (napr. izokvercitrín) sú lákavé pre hmyz ako potrava a naopak kondenzované taníny hmyz odpudzujú. Izoflavonoidy fungujú i ako antimykotiká. Špecifické flavonoidy (napr. kempferol) poskytujú rastlinám ochranu voči účinkom UV-B žiarenia. Flavonoidy sa preukázali aj ako protirakovinovo pôsobiace látky, ďalej bránia priepustnosti krvných kapilár, majú protizápalový a anti-trombický účinok.<sup>238</sup> Určité flavonoidy prijímané v strave dokážu ovplyvniť koncentráciu zápalového cytokínu IL-6 v krvi. Ďalšie štúdie preukázali inhibíciu aj iných zápalových biomarkerov.<sup>251, 252</sup>

V prevedených *in vitro* štúdiách prakticky všetky testované flavonoidy vykazujú protizápalové vlastnosti pôsobiace na rôzne typy bunkových kultúr. Znižujú expresiu alebo potláčajú funkciu

zápalových mediátorov vrátane eikosanoidov, NO, adhézných molekúl a cytokínov. Zároveň sa v nízkych koncentráciách žiaden neprejavil ako toxický.<sup>253</sup>

Flavonoidy ako súčasť stravy boli často skúmané v spojitosti so zápalmi črevnej sliznice. Medzi flavonoidy vykazujúce významný terapeutický efekt pri liečbe IBD patria:

• kurkumín – táto látka vykazovala v *in vitro* testoch signifikantný protizápalový potenciál.<sup>254–256</sup> Avšak v klinických testoch nepotvrdila svoju *in vivo* efektívnosť predovšetkým kvôli svojej nestabilite, reaktivite a nízkej biologickej dostupnosti, kedy je väčšina látky z tela vylúčená.<sup>257</sup> Nízka rozpustnosť vo vode zapríčiňujúca nízku biologickú dostupnosť by mohla byť zredukovaná enkapsuláciou kurkumínu napr. do lipozómových častíc.<sup>258, 259</sup>

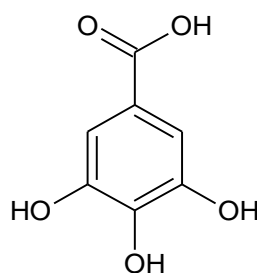
- genisteín – izoflavonoid s fytoestrogénnymi vlastnosťami, schopný inhibovať angiogénu,
- hesperidín – flavanónový glykozid, nachádzajúci sa predovšetkým v citrusových plodoch a v mäte piepornej. Jeho aglykón sa nazýva hesperetín.<sup>260</sup>
- morín – flavonol, zmierňujúci alergické reakcie a znižujúci zápalové mediátory,<sup>261, 262</sup>
- myricetín – flavonol známy svojimi protizápalovými, antioxidantnými, antikancerogénnymi, antitrombotickými, antiaterosklerotickými a neuroprotektívnymi vlastnosťami,<sup>263, 264</sup>
- kvercitrín – glykozid zložený z flavonoidu kvercetínu a ramnózy,
- rutín – chemická zlúčenina patriaca medzi bioflavonoidné glykozidy, jej aglykón sa nazýva kvercetínu. Pripisuje sa jej schopnosť spevňovať krvné kapiláry, zvyšovať pružnosť ciev, znižovať LDL cholesterol, posilňovať účinok vitamínu C, ďalej vykazuje antioxidantné a antikarcinogénne vlastnosti. Podobne ako flavonoly má nízku biologickú dostupnosť.<sup>265, 266</sup>

Flavonoidy majú ďalej schopnosť modulovať rast baktérií v kultúre spolu s CaCo-2 bunkami, vykazujú tak potenciál ovplyvňovať črevnú mikrobiotu *in vivo*.<sup>267</sup>

Flavonoly prejavili prebiotický potenciál indukciou množenia laktobacilov a bifidobaktérií a čiastočne by mohli byť zodpovedné za zníženie C-reaktívneho proteínu ako krvného markeru zápalu v akútnej fáze zápalu. Podobný prebiotický efekt bol zaznamenaný u nápoja s extrahovanými antokyánmi z čučoriedok.<sup>248, 250</sup>

#### 2.4.2.2 Fenolové kyseliny

Prevažnú väčšinu tejto skupiny fenolických látok tvoria hydroxyškoricové kyseliny vo forme esteru, pričom najznámejšie sú kyselina kávová a jej estery a kyselina gallová (obrázok 10). Ďalšie zlúčeniny patriace do tejto skupiny sú kondenzované taníny obsahujúce fenolové kyseliny esterifikované polyhydroxylzlučeninami. Fenolové kyseliny sa prirodzene vyskytujú najmä v ovocí, zelenine a káve.<sup>238</sup>



Obr. 10: Štruktúrny vzorec kyseliny gallovej

#### 2.4.2.3 Stilbény a lignány

Tieto látky sa zaraďujú medzi fytoestrogény, lebo majú podobné vlastnosti ako ženský hormón estrogén. Fytoestrogény sa viažu na estrogénový receptor cicavcov a vyvolávajú efekty podobné pôsobeniu endogénnych estrogénov.<sup>268</sup> Najznámejšie sú stilbén a resveratrol. Stilbén vykazuje antimikrobiálne účinky.<sup>269</sup> Resveratrol je derivát stilbénu, významný antioxidant, látka schopná modulovať krvný tlak, imunitný systém a energetický metabolizmus.<sup>270–272</sup>

Lignány sú 18-uhlíkaté látky zložené z dvoch fenypropánových jednotiek.<sup>273</sup> Patrí medzi ne matairesinol a secoisolariciresinol, ktoré sa v organizme za prítomnosti a pôsobenia črevnej mikroflóry menia na enterolaktón a enterodiol. Vykazujú antioxidačnú aktivitu a uplatňujú sa v prevencii kardiovaskulárnych a niektorých nádorových ochorení.<sup>274</sup>

### 2.4.3 Karotenoidy

Karotenoidy sú prírodné farbivá vyskytujúce sa v rastlinách, hubách, riasach a baktériách. Rastliny obsahujú viac ako 700 rôznych druhov karotenoidov, napr. lykopén ako červené farbivo v paradajkách alebo  $\beta$ -karotén, známe oranžové farbivo v mrkve, broskyniach či tekviciach. Karotenoidy patria do rodiny tetraterpénov ( $C_{40}$  izoprenoidy), lipofilných organických látok. Podľa obsahu kyslíka vo svojej štruktúre sa delia na xantofyly a karotény.<sup>225, 268</sup>

Z celkového množstva známych karotenoidov predstavuje len 40–50 druhov význam v ľudskej výžive. V závislosti na karotenoidovej štruktúre, niektoré karotenoidy vykazujú provitamín-A aktivitu. V ľudskom sére je možné nájsť hlavne karotenoidy  $\alpha$ - a  $\beta$ -karotén, lykopén a ďalej xantofyly (luteín, zeaxantín,  $\beta$ -kryptoxantín) v závislosti od stravovacích návykov. Ľudský organizmus nie je schopný syntetizovať karotenoidy, preto musia byť prijímané v strave. Obsah karotenoidov a ich absorpcia v ľudskom organizme sa líši v závislosti na jej úprave. Lykopeny a  $\beta$ -karotén sú pomerne odolné voči ohrevu, xantofyly sú naopak citlivé na zžehvenie.<sup>275</sup>

Dáta z epidemiologických humánných štúdií podobne ako štúdie prevádzané na zvieracích modeloch dokazujú, že karotenoidy špecificky ovplyvňujú imunitný systém. V štúdií, kde bola v časovom horizonte dvoch rokov sledovaná hladina celkových karotenoidov v krvnom sére bolo zistené, že účastníci s najnižšími hodnotami mali signifikantne zvýšené hladiny IL-6.<sup>276</sup> Karotenoidy ďalej vykazujú významné antioxidačné schopnosti, blahodarný vplyv na zdravie očí, kognitívne funkcie a kardiovaskulárny systém. Epidemiologické štúdie naznačujú, že strava bohatá na karotenoidy je spojená s nižším výskytom ochorení ako rakovina, osteoporóza, diabetes, katarakt či infekcie HIV.<sup>275, 277–279</sup>

Vybrané karotenoidy ( $\beta$ -karotén, luteín, zeaxantín, lykopén, astaxantín a kantaxantín) sú priemyselne produkované a používajú sa pri výrobe doplnkov stravy a pri fortifikácii potravín. Je ich taktiež možné využiť ako farbivá v potravinách, nápojoch a farmaceutických výrobkoch.<sup>275, 280</sup>

### 2.4.4 Vybrané druhy rastlín s vysokým obsahom protizápalových látok

#### 2.4.4.1 Brusnica čučoriedková (*Vaccinium myrtillus*)

Čučoriedka je ker rastúci do výšky 20–50 cm s drevnatejúcimi podzemnými výbežkami. Bobule sú typicky modročierne, výnimočne však i belavé, zelenobiele alebo červené. Rastlina je rozšírená po celej Európe najmä v stredných polohách na kyslých pôdach.

Plody sú osvedčeným prostriedkom pri hnačkách, antibakteriálne pôsobia proti stafylokokom a baktérii *E. coli*. Priaznivo pôsobia na cievne steny a na regeneráciu očnej sietnice, dezinfekčne pri zápale ústnej dutiny a hrtanu. Preventívny účinok proti vzniku zápalov bol popísaný pôsobením extraktov z čučoriedok na aktiváciu mikroglií.<sup>281, 282</sup> Chránia pred stareckou demenciou, majú upokojujúci účinok. Plody je možné konzumovať surové, ale sú i obľúbeným ovocím pri výrobe džemov, sirupov a vína. Sensorickou hodnotou a obsahom dôležitých živín sa čučoriedky radia k najcennejšiemu ovociu na našom území.<sup>274, 283, 284</sup>

Bioaktívne látky (zrelý plod): kyselina jablčná, citrónová, benzoová, citrakonová, chlorogénová, triesloviny (asi 7 %), tuky, vláknina, pektín, pektóza, flavónové farbivá, karotenoidy ( $\beta$ -karotén, luteín), provitamín A, resveratrol, vitamín C, vitamíny skupiny B, vitamín E, minerálne látky (horčík, draslík, bór, fosfor, siera, fluór, mangán, železo, meď, zinok, chróm), kvercetín, izokvercitrín, kempferol, myricitrín, fenolové kyseliny (hydroxycinamová, kávová, ferulová), glykozidy, fytoantokyan, delfinidín, 3-rutinozid, rutín, myrtillinchlorid.<sup>274</sup>

#### 2.4.4.2 *Brusnica pravá (Vaccinium vitis-idaea)*

Celoročne zelený, drevnatejúci 10–30 cm vysoký ker s červenými bobuľami. Výskyt v chladnejších častiach Európy, hojne v podhorských až horských oblastiach.

Brusnica vykazuje močopudné a dezinfekčné účinky, užíva sa preto predovšetkým pri zápaloch močových ciest. Mierni hnačku, môže sa podávať ako podporný prostriedok pri liečbe diabetu a ochorení žľzníka. Pre vyšší obsah kyseliny šťaveľovej sú plody kontraindikované pri problémoch s obličkami.<sup>285</sup> Surové plody sú nepožiteľné, ale nachádzajú svoje využitie pri výrobe kompótov, džemov, sirupov a iných pochutín.<sup>274</sup>

Bioaktívne látky (plod): kyselina askorbová, šťaveľová, gallová, benzoová, arbutín, kempferol, kvercetín, myricetín, kyanidín, peonidín, triesloviny, hydrocholín, cholesterín, tanín, vaccínin, horčík, železo, zinok, bór, farbivá, pektín, vláknina, vitamíny skupiny B, vitamín C, karotenoidy, bioflavonoidy.<sup>274</sup>

#### 2.4.4.3 *Kurkuma pravá (Curcuma longa)*

Kurkuma je trváca rastlina z čeľade d'umbierovité (*Zingiberaceae*) rastúca v tropických a subtropických oblastiach. Jej podrvený pakoreň sa používa ako korenie, olej, liečivo alebo na výrobu farbiva. Hlavným producentom je India, kde sa používa ako ľudové liečivo niekoľko storočí.<sup>286</sup>

Najlepšie popísanou látkou extrahovanou z koreňa kurkumy je chemoprotektívny fenolický derivát kurkumín. Dodáva kurkume jej typické žlté sfarbenie, vďaka ktorému sa môže využiť i ako žlté potravinárske farbivo. Vykazuje navyše antikatabolické, antioxidantné a protizápalové vlastnosti. Kurkumín však vo svojej prírodnej forme má veľmi nízku biologickú dostupnosť.<sup>257</sup> Protizápalové vlastnosti kurkumínu spočívajú v jeho schopnosti inhibovať fosfolipázu A<sub>2</sub>, COX-2 a lipooxygenázy, a zníženie expzie IL-6, IL-8 a PGE<sub>2</sub>.<sup>287</sup> V prípade kurkumínu je dôležitým faktorom koncentrácia a doba pôsobenia, pretože môže vykazovať ako antioxidantné, tak prooxidantné vlastnosti za určitých podmienok.<sup>288–290</sup>

Protizápalové účinky kurkumy spočívajú v znižovaní produkcie histamínu indukujúceho zápal, v zvyšovaní a predlžovaní pôsobenia hormónu kortizolu a podnietením cirkulácie sa zamedzuje usadzovaniu toxínov. Okrem toho pozitívne vplyva na trávenie, produkciu žľzových a tráviacich štiav, zlepšujúc tak digestiu tukov a elimináciu toxínov z pečene.<sup>291</sup> Užívanie kurkumy pri konvenčnej liečbe IBD zvyšuje jej efektívnosť.<sup>292, 293</sup>

Bioaktívne látky: kurkuminoidy (kurkumín, demetoxylkurkumín, bisdemetoxylkurkumín), prchavé oleje (turmerón, atlantón, zingiberón), oleoresíny, minerály, felandrén, sabinén, cineol, boreol.<sup>291</sup>

#### 2.4.4.4 *Mäta pieporná (Mentha piperita)*

Mäta pieporná je vytrvalá rastlina z čeľade hluchavkovitých. Je to prirodzený hybrid odrôd mäty vodnej a mäty klasnatej. Môže sa vyskytovať v rôznych kultivaroch. Málokedy rastie vo voľnej prírode, vyžaduje špeciálne podmienky. Jedná sa o populárnu rastlinu s obrovským množstvom využití. Mäťový olej je typický svojou silnou arómou a chladivým efektom. Využíva sa v kozmetike, produktoch osobnej hygieny, v potravinárstve, farmakopriemysle a pod.

Mäta pôsobí pozitívne na trávenie, odstraňuje kŕče, podporuje vylučovanie tráviacich štiav, pôsobí protizápalovo, ďalej pomáha pri meteorizme, priaznivo ovplyvňuje funkciu pečene a pankreasu, znižuje bolestivosť pri ochoreniach tráviaceho traktu. Mierne napomáha znižovať vysoký krvný tlak a inhalácia jej pár je vhodným prostriedkom pri liečbe zápalových ochorení dýchacích ciest. Mäta by sa však nemala podávať dlhodobo a v nadmerných dávkach, kontraindikovaná je taktiež u osôb alergických na mentol. Súčasťou mladých lístkov mäty je látka pulegón, ktorá sa neskôr premieňa na mentol. Pulegón je známy hepatotoxín a potenciálny neurotoxín. Jeho koncentrácia sa líši v závislosti na zdroji, ale nesmie prekročiť 1 %.<sup>294–296</sup>

Bioaktívne látky: mentol, mentón, 1,8-cineol, metyl acetát, mentofurán, izomentón, limonén, β-pinén, α-pinén, α-felandrén, β-karyofyllén, karvón, limonén, germakrén-d, trans-sabinén hydrát, pulegón, kyselina rozmarínová, hesperidín, eriocitrín, luteolín.<sup>274, 297</sup>

#### 2.4.4.5 Rumanček kamilkový (*Matricaria recutita*)

Rumanček (ľud. „harmanček, kamilka“) je liečivá vonná rastlina čeľade astrovitých, rastúca na rumoviskách a lúkach. V liečiteľstve sa používa sušený kvet, pričom odvar z rumančeka pôsobí protizápalovo a baktericídne, podieľa sa na rýchlejšom hojení rán zamedzujúc tvorbe jaziev, čaj z kvetov pomáha pri žľúdočných ťažkostiach a spánkových poruchách. Je vhodný i ako ústna voda pri liečbe ústnej sliznice. *In vitro* testy rumančeka odhalili jeho význačné antioxidačné a antimikrobiálne vlastnosti, predbežne sa javí účinne aj proti tumorom, ďalej proti úzkosti, esenciálne oleje pôsobia antivirovicky pri *Herpes simplex* a jeho metanolový extrakt vykazoval potenciálne antialergické vlastnosti.<sup>298</sup> Samotná rastlina však môže vyvolať alergickú reakciu u citlivého jedinca.<sup>298–302</sup>

Bioaktívne látky: terpeny ( $\alpha$ -bisabolol, apigenín, azulén,  $\beta$ -karyofylén, bisabolén, bisabolol, borneol, trans- $\alpha$ -farnezen, trans- $\beta$ -farnezen, farnezol, geraniol, guajazulén, chamazulén, chamomillol, kempferol, levonenol, matricín, matrikarín, thujon), aromatické kyseliny (kyselina salicylová, deriváty kyseliny benzoovej, kyselina kávová), kumaríny, steroidy (sitosterol, stigmasterol), flavonoidy (apigenín, luteolín, kvercetín), sacharidy, glykozidy, vitamíny (kyselina askorbová, niacín, tiamín).<sup>299</sup>

#### 2.4.4.6 Škorica (*Cinnamomum zeylanicum*)

Škorica je aromatická kôra škoricovníkov, stálo zelených tropických stromov, pričom najkvalitnejšia sa získava zo škoricovníka cejlónskeho. Má korenisto-sladkastú chuť a príjemnú vôňu, ktorú jej dodáva najmä zlúčenina cinnamaldehyd.<sup>303</sup> Zo škoricovníka sa využíva sušená vnútorná časť kôry bohatá na silice. Z listov, vetiev a kvetov sa získava škoricový olej. Táto rastlina sa využíva v rôznych priemyselných odvetviach; v potravinárstve, vo farmaceutickom priemysle, v likérsníctve a pri výrobe vína, ďalej v kozmetike a pre svoju typickú vôňu sa využíva i pri výrobe parfumov.

Škorica pomáha pri kardiovaskulárnych problémoch, znižuje krvný tlak, zmiernuje menštruáciu, zlepšuje trávenie (napomáha metabolizmu tukov, má vplyv na pokles hladiny plazmatickej glukózy), upokojuje koliky, nevoľnosti, slúži ako prostriedok proti nádche, kašľu, chrípke a pri vonkajšom použití sa používa pri liečbe reumatizmu. Zvyšuje apetít, podporuje trávenie vďaka stimulácii tráviacich enzýmov a celkovo pôsobí osviežujúco. Dostupné *in vitro* a *in vivo* testy dokázali, že škorica má protizápalové, antibakteriálne, antioxidačné, protinádorové účinky, stimuluje imunitu a znižuje cholesterol. Benzoátu sodnému ako bioaktívnej súčasti škorice sa pripisuje inhibičný efekt na iNOS, zápalové markery a povrchové markery aktivácie zápalu v myších mikrogliách.<sup>304–307</sup>

Bioaktívne látky: benzoát sodný, cinnamaldehyd, etylcinnamát, kvercetín, kvercitrín, kempferol, eugenol, kumarín, kyselina škoricová, linalool, safrol.<sup>303</sup>

#### 2.4.4.7 Zázvor pravý (*Zingiber officinale*)

Zázvor je vytrvalá rastlina, vyhánajúca z dužinatého hľuzovito zhrubnutého článkovitého podzemku každý rok niekoľko štíhlych cez 1 meter vysokých býľ. Zázvor patrí do rodiny *Zingiberaceae* a využíva sa ako korenie už viac ako 2 000 rokov.

Súčasť zázvoru zingerón vykazoval značné protizápalové účinky u myši s kolitídou. Ovplyvňoval najmä expresiu génov spojených s dráhami riadenými zápalovými cytokínmi. Potláčal aktiváciu NF- $\kappa$ B a IL-1 $\beta$  v hrubom čreve.<sup>308</sup> Zázvor tiež moduluje určité biochemické dráhy v chronickom zápale. Fenolické zlúčeniny zo zázvoru (zerumbón, 3-*O*-metylkampferol) preukázateľne znížili hladinu NO a prostaglandínu E<sub>2</sub> produkovanými makrofágmi stimulovanými bakteriálnymi lipopolysacharidmi.<sup>309</sup> Zázvor ďalej stimuluje trávenie, tráviace šťavy a vykazuje značné antioxidačné vlastnosti.<sup>310–313</sup>

Bioaktívne látky: 6-gingerol,  $\beta$ -felandrén, (+)-kamfén, cineol, geraniol, kurkumín, demetoxykurkumín, 6-dehydrogingerdión, citral, terpineol, borneol,  $\alpha$ -zingiberén,  $\beta$ -seskvifelandrén,  $\beta$ -bisabolén,  $\alpha$ -farnezen, arkurkumén, zingiberol, 6-shogaol, zerumbón, 3-*O*-metylkampferol.<sup>312</sup>

#### 2.4.4.8 Ľan siaty (*Linum usitatissimum*)

Ľan je jednoročná rastlina pestovaná pre ľanové vlákno a olejnaté semená. Semená sa používajú pri zápche, zápale žalúdka a čriev, pri vredoch žalúdka a pankreasu. Pre pôsobenie v črevách sa

konzumuje celé alebo čerstvo pomleté semeno. Ľanový olej sa získava lisovaním a následnou rafináciou semien olejnatého ľanu za studena. Olej vykazuje biologické účinky kyseliny linolovej a  $\alpha$ -linolovej. Oba typy kyselín zaisťujú štruktúrnú integritu bunkových membrán. Je jedným z najbohatších potravinových zdrojov ALA, a tým i  $\omega$ -3-nenasýtených mastných kyselín EPA a DHA. Narozdiel od rybieho oleja však nemá dlhodobá konzumácia vplyv na triacylglyceroly, tkanivovú koncentráciu DHA, hladinu cholesterolu a citlivosť k oxidácii cholesterolu *in vitro*. Strava so zníženým obsahom tuku doplnená ľanovým olejom má výrazne priaznivý vplyv na kardiovaskulárny systém, zvyšuje elasticitosť artérií a môže upraviť cirkulačné funkcie. Olej môže znížiť agregáciu trombocytov. Je vhodným doplnkom pri liečbe zápalových procesoch, pri ktorých vznikajú prostaglandíny a leukotriény. Tlmí tvorbu IL-1, TNF a nekyslíkatých radikálov polymorfonukleárných leukocytov a monocytov. Ďalej môže byť použitý pri ovplyvňovaní hypertriglycerolémie, hypercholesterolémie, benígnej hyperplázie prostaty, psychickej tenzie a pre zníženie telesnej hmotnosti. V dávkach nad 25 g denne pôsobí laxatívne.<sup>314-318</sup>

Bioaktívne látky (ľanový olej): PUFA (okolo 60 %), MUFA, SFA, menej ako 2 % nezmydeliteľného podielu (cholesterol, kampesterol, stigmasterol,  $\Delta^7$ -stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol,  $\Delta^5$ -avenasterol,  $\Delta^7$ -avenasterol).

## 2.5 Enkapsulácia v potravinárskom priemysle

Enkapsulácia je proces slúžiaci k zachyteniu účinných látok (jadrového materiálu) do transportného materiálu. Dochádza k vytvoreniu bariéry (zo samotnej matrice, resp. polymérneho obalu) okolo aktívnej zlúčeniny a tým k obmedzeniu deštruktívnych chemických interakcií. Žiaduce biologicky aktívne látky sú stabilizované a efektívnejšie chránené pred vplyvom prostredia (napr. teplotnými zmenami, pH, enzýmom a oxidačnými reakciami). Enkapsulácia ďalej prispieva k zlepšeniu prenosu bioaktívnych molekúl do živých buniek a kontrolovanému uvoľňovaniu daných látok v organizme. To zaisťuje, že sa ku spotrebiteľom dostanú vo vhodnej využiteľnej forme, je predĺžená ich životnosť, zabraňuje, resp. spomaľuje sa proces vzniku nebezpečných zlúčenín ako výsledku chemických zmien po určitej dobe. Zároveň sa môžu maskovať niektoré neprijemné organoleptické predispozície.<sup>319</sup>

Proces enkapsulácie pre potravinárske účely musí spĺňať prísne kritéria bezpečnosti a vhodnosti použitých materiálov, čo znamená, že musia byť netoxické a biologicky odbúrateľné. Samotné častice nesmú vykazovať toxikologické riziko pre konzumenta a zároveň musia byť všeobecne považované za bezpečné (tzv. „GRAS“) podľa požiadaviek Európskeho úradu pre bezpečnosť potravín (EFSA).

Pri aplikácii v potravinárskom priemysle bolo popísaných niekoľko možných metód enkapsulácie. Výber optimálnej enkapsulačnej techniky závisí na type východiskového materiálu a požadovanom charaktere finálneho produktu. Mnoho faktorov významne ovplyvňuje konečný výsledok a enkapsulačnú účinnosť. Je preto vždy potrebné starostlivo zvážiť výber a vlastnosti obalovej matrice a samotný postup enkapsulačnej techniky.

Najčastejšie používané enkapsulačné materiály sú proteínové a sacharidové polyméry. Vlastnosti enkapsulačného materiálu sa prejavujú vo finálnom produkte; ovplyvňujú veľkosť, tvar a štruktúru častíc, stabilitu počas produkcie, skladovania a konzumácie voči vonkajším vplyvom prostredia a taktiež samotné uvoľňovanie enkapsulovaných zlúčenín. Mikrokapsle sú navrhnuté tak, aby postupne uvoľňovali aktívne zložky. Látky môžu intenzívnejšie difundovať po pôsobení faktorov ako napr. teplo, solvátácia, difúzia, tlak atď. Väčšina konvenčne vyrábaných mikrokapslí však má tendenciu byť veľmi porézna, čo spôsobuje rýchlu difúziu vody a iných tekutín. Obalové materiály môžu byť rôzne kombinované pre spomalenie nežiadúceho rozpadu a naopak podporu požadovaných vlastností.<sup>320, 321</sup>

### 2.5.1.1 Enkapsulácia probiotických baktérií

U probiotických buniek je dôležité zachovať pri enkapsulácii ich viabilitu počas trávenia v hornej časti tráviacej sústavy, aby sa čo najväčší počet životaschopných buniek dostal do čreva. Taktiež je potrebné ich ochrániť pred vplyvom vonkajšieho prostredia pri skladovaní a spracovávaní. Prežívanie probiotík

ovplyvňuje použitý bakteriálny kmeň, intermikrobiálne interakcie, vplyv matrice, kultivačné podmienky, pH, teplota, osmotický tlak, inhibítory, množstvo rozpusteného kyslíka, doba skladovania či podmienky počas samotného trávenia. Pri výbere konkrétnej enkapsulačnej techniky je treba zvážiť enkapsulačnú efektívnosť, náročnosť a ekonomickú záťaž prípravy. Okrem toho je dôležité vziať do úvahy i ovplyvnenie výslednej chuti či textúry.

V praxi patria medzi najčastejšie používané materiály pre enkapsuláciu probiotík alginát, chitosan, škrob, celulóza, karagénan, xantán, pektín, gellan, albumín, želatína, kolagén, kazeín atď. Probiotiká vo forme výživových preparátov v kapsliach sú zvyčajne lyofilizované častice.<sup>322-324</sup> Lyofilizácia, resp. sublimačné sušenie, je proces slúžiaci k dehydratácii a enkapsulácii takmer všetkých tepelne citlivých materiálov, živých buniek a vo vode rozpustných aromatických látok, esencií a nestabilných prírodných fytochemikálií.<sup>325, 326</sup> Nosič a aktívna látka sa najprv rozpustia vo vode a následne zmrazia. V ďalšom kroku je z materiálu v lyofilizátore za zníženého tlaku sublimáciou odstránená voda.<sup>319, 327</sup>

### 2.5.1.2 Alginát

Alginát je lineárny hydrofilný heteropolysacharid extrahovaný z morských rias. Získava sa ako sodná soľ extrakciou rias alkalickými činidlami (NaOH, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Obsahuje dve štruktúrne podjednotky; D-mannurónovú a L-gulurónovú kyselinu. V závislosti na zdroji sa môže zloženie a zastúpenie týchto kyselín v polyméri líšiť.

K vytvoreniu kapsle je potrebné zmiešať bunkovú suspenziu s roztokom alginátovej sodnej soli. Zmes je následne kvapkaná do roztoku obsahujúceho multivalentné kationy (zvyčajne Ca<sup>+2</sup> vo forme CaCl<sub>2</sub>). Kvapôčky ihneď tvoria gélové štruktúry, zachytávajúc pritom bunky v trojdimenzionálnej sieti. Zosieťovanie polyméru je výsledkom výmeny sodných iónov z gulurónových kyselín s dvojmocnými kationmi. Toto zosieťovanie vedie k vzniku štruktúry prezývanej „egg-box model“.<sup>328</sup>

Alginát je v potravinárstve obľúbenou látkou, využíva sa i ako zahusťovadlo, emulzifikátor či stabilizátor. Možnosť použitia tohto polyméru ako enkapsulačnej matrice spočíva najmä v jeho biokompatibilite a vo vytvorení prostredia šetrného i k senzitivnejším látkam a bunkám. Rozmer a tvar výsledných častíc závisí hlavne na priemere trysky enkapsulátora, ďalej na viskozite roztoku alginátovej sodnej soli a vzdialenosti medzi tryskou a vytvrdzovacím roztokom. Algináty s nízkym obsahom gulurónových kyselín tvoria vo všeobecnosti menšie častice.<sup>323, 329</sup>

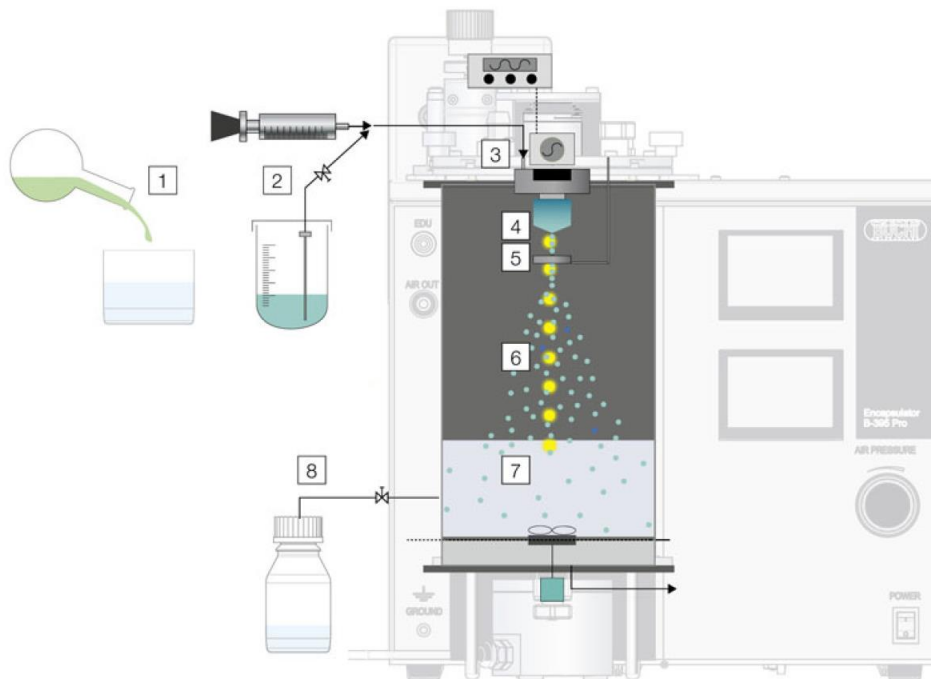
Bolo potvrdené, že u probiotík enkapsulovaných a chránených alginátom sa signifikantne zvyšuje ich prežitie. Baktérie sú chránené pred narušujúcimi účinkami žalúdočnej šťavy a môžu sa tak uvoľňovať až v prostredí čreva.<sup>330</sup>

### 2.5.1.3 Enkapsulátor

Poloautomatický prístroj, tzv. enkapsulátor (v tejto práci použitý typ Büchi B-395 Pro), slúži k obaleniu bioaktívnych zlúčenín, buniek a mikroorganizmov polymérnymi obalmi za sterilných alebo nesterilných podmienok. Skladá sa z regulačnej jednotky so striekačkovým čerpadlom, elektrickým a pneumatickým systémom a z reakčnej nádoby (obrázok 11). Veľkosť trysky určuje výslednú veľkosť častíc.

Princíp metódy spočíva v pretlačení zmesi enkapsulovanej látky a polyméru pomocou stlačeného vzduchu z tlakovej nádoby do pulznej komory. V ďalšom kroku zmes prechádza systémom trysiek definovaných veľkostí, kedy na konci trysky dochádza k rozdeľovaniu prúdu na kvapôčky. Medzi tryskou a elektródou je generované elektrické pole spôsobujúce povrchové nabitie častíc. To vyvoláva silné elektrostatické odpudivé sily, ktoré udržiavajú jednotlivé kvapky od seba. Následne dopadajú do uzemneného vytvrdzovacieho roztoku (napr. CaCl<sub>2</sub>). Pri jeho neustálom premiešavaní magnetickou miešačkou sa zabráňuje zhlukovaniu vytvorených častíc.<sup>331</sup>





Obr. 11: Schéma enkapsulátora B-395 Pro (1. príprava zmesi obsahujúcej enkapsulovanú zložku a polymérny obal; 2. pumpovanie zmesi z tlakovej nádoby do pulznej komory; 3. pulzná komora; 4. tvorba kvapôčok v tryske; 5. rozdeľovanie a disperzia kvapôčok; 6. vizualizácia jednotlivých častíc; 7. formovanie častíc vo vytvrdzovacom roztoku; 8. zberná nádoba)<sup>331</sup>

### **3 CIEĽ PRÁCE**

Hlavným cieľom tejto práce je vývoj a charakterizácia moderných doplnkov stravy s obsahom probiotík a látok s protizápalovým účinkom.

K dosiahnutiu cieľa boli vymedzené tieto čiastkové ciele:

- 1) Výber, charakterizácia a izolácia zvolených aktívnych látok.
- 2) Enkapsulácia zvolených aktívnych látok, probiotík a ich zmesí.
- 3) Návrh optimálneho zloženia doplnkov stravy s obsahom zvolených protizápalových látok a probiotík.

## 4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 4.1 Použité látky a prístroje

#### 4.1.1 Protizápalové látky

Jednotlivé extrakty vykazujúce potencionálne protizápalové účinky, využívané v analýzach, boli pripravené z nasledujúcich vzoriek (tabuľka 6):

Tab. 6: Názov produktu a dodávateľa vybraných prírodných materiálov

			
<b>1) „Brusinka – šťáva 100%“</b> Look Food, ČR	<b>2) „Bio borůvková šťáva“</b> Beutelsbacher Fruchtsaftkelterei, Nemecko	<b>3) „Bio kurkuma mletá“</b> Bionebio, India	<b>4) „Máta peprná – nat' (bylinný čaj)“</b> Valdemar Grešík, ČR
			
<b>5) „Heřmánek – květ“</b> Valdemar Grešík, ČR	<b>6) „Skořice bio mletá, druh Cejlon“</b> Sonnentor, Madagaskar	<b>7) „Zázvor mletý“</b> Valdemar Grešík	<b>8) „Lněné semínko – mleté“</b> Semix Pluso, ČR

#### 4.1.2 Použité mikroorganizmy

Enkapsulované a testované boli nasledujúce probiotické bakteriálne kultúry pochádzajúce z Českej zbierky mikroorganizmov Masarykovej univerzity so sídlom v Brne:

- *Bifidobacterium breve* (CCM 7825<sup>T</sup>),
- *Lactobacillus acidophilus* (CCM 4833).

#### 4.1.3 Použitá bunková línia

K *in vitro* funkčným testom na ľudských črevných epiteliálnych bunkách bola zvolená adherentná bunková línia CaCo-2 (300137) zo zbierky bunkových kultúr Cell Lines Services (Nemecko) izolovaná z adenokarcinómu hrubého čreva 72-ročného muža kaukazského typu.

#### 4.1.4 Použité chemikálie

##### ***Chemikálie použité pri extrakcii a charakterizácii vzoriek:***

- 2,2-azinobis(3-etylbenzotioazolín)-6-sulfónová kyselina (ABTS), Sigma-Aldrich (Nemecko)
- 6-hydroxy-2,5,7,8-tetrametylchroman-2-karboxylová kyselina (TROLOX), Sigma-Aldrich (Nemecko)
- Acetón, LachNer (Česká republika)
- Aloenin A, Sigma-Aldrich (Nemecko)
- Apigenín, Sigma-Aldrich (Nemecko)
- $\beta$ -karotén 95% typ I: syntetický, Sigma-Aldrich (Nemecko)
- Daidzeín, Sigma-Aldrich (Nemecko)
- Dimetylsulfoxid, Lachema (Česká republika)
- Dusitan sodný, Vitrum-LachNer (Česká republika)
- Epikatechín, Sigma-Aldrich (Nemecko)
- Etanol, LachNer (Česká republika)
- Floridzín, Sigma-Aldrich (Nemecko)
- Folin-Ciocalteuovo činidlo, Penta (Česká republika)
- Hesperidín, Sigma-Aldrich (Nemecko)
- Hydroxid sodný p. a., LachNer (Česká republika)
- Chlorid hlinitý, Vitrum-LachNer (Česká republika)
- Chloroform, Penta (Česká republika)
- Katechín, Sigma-Aldrich (Nemecko)
- Kvercitrín-3-glukozid, Sigma-Aldrich (Nemecko)
- Kyselina gallová, Sigma-Aldrich (Nemecko)
- Kyselina chlorogénová, Sigma-Aldrich (Nemecko)
- Kyselina kávová, Sigma-Aldrich (Nemecko)
- Kyselina kumarová, Sigma-Aldrich (Nemecko)
- Metanol pre HPLC, Sigma (Nemecko)
- n-hexán pre HPLC, VWR (USA)
- Pelargonidín-3-glukozid chlorid, Sigma-Aldrich (Nemecko)
- Peroxodisíran draselný, Sigma-Aldrich (Nemecko)
- Uhličitan sodný p. a., LachNer (Česká republika)

##### ***Chemikálie použité pri kultivácii a testovaní baktérií:***

- Agar powder, Himedia (India)
- MRS Broth médium, Himedia (India)

##### ***Chemikálie použité pri testovaní s modelovými tráviacimi šť'avami a črevnými bunkami:***

- 3-[4,5-dimetyltiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid, Sigma-Aldrich (Nemecko)
- Antibiotic-antimycotic 100 $\times$  (Biosera), Biotech (Nemecko)
- Bile salts – zmes kyseliny cholovej a deoxycholovej, Sigma-Aldrich (Nemecko)
- Dihydrogénfosforečnan sodný monohydrát p. a., LachNer (Česká republika)
- Dodecylsírán sodný, Serva (Nemecko)
- Etylendiamíntetraoctová kyselina (EDTA), Serva (Nemecko)
- FBS, HyClone (USA)
- Hydrogénfosforečnan sodný dihydrát p. a., LachNer (Česká republika)
- Hydrogénuhličitan sodný p. a., LachNer (Česká republika)
- Kyselina chlorovodíková 35%, LachNer (Česká republika)
- MEM Non-essential Amino Acid Solution (100 $\times$ ), Sigma-Aldrich (Nemecko)
- Pankreatín (bravčový pankreas), Sigma-Aldrich (Nemecko)
- Pepsín (prasacia žalúdočná sliznica), Sigma-Aldrich (Nemecko)

- Trypanová modrá, Biotech (Nemecko)
- Trypsín, Versene EDTA, P-Lab (Česká republika)

***Chemikálie použité pri enkapsulácii:***

- Alginát sodná soľ, Sigma-Aldrich (Nemecko)
- Chlorid vápenatý p. a., Lachema (Česká republika)

#### **4.1.5 Prístroje a pomôcky**

- Analytické váhy, Boeco (Nemecko)
- Automatické pipety v rôznych objemových rozsahoch, Discovery a Biohit (Nemecko)
- Biohazard box, model Airstream, trieda II - ESCO, Biotech (Nemecko)
- CelCulture CO<sub>2</sub> inkubátor – ESCO, Biotech (Nemecko)
- Centrifúga Boeco U-32R, Hettich Zentrifugen (Nemecko)
- ELISA Reader BioTek ELx808, Biotek (Nemecko)
- Enkapsulátor Büchi B-395 Pro (Švajčiarsko)
- Inverzný mikroskop, Laboserv (Česká republika)
- Laminárny box Aura mini – Bioair, EuroClon (Taliansko)
- Mikrocentrifúga Mikro 120, Hettich Zentrifugen (Nemecko)
- MiniInkubator Labnet (Labnet international Inc., New Jersey, USA)
- NanoPhotometer™, Implen (Nemecko)
- Optický mikroskop Intraco Micro LM 666 PV/∞ LED (Česká republika)
- Predvážky Kern 440-43, Kern & Sohn GmbH (Nemecko)
- Software Dino-Capture 2.0 (Česká republika)
- Soxhletov extraktor – Soxtherm, Gerhardt (Nemecko)
- Spektrofotometer – Helios γ, Unicam (Veľká Británia)
- Temperovaná trepačka, Heidolph Inkubator 1000 (Nemecko)
- Termostat Memmert GmbH Co. KG (Nemecko)
- Vákuová odparka Werke RV06-ML: IKA (Nemecko)
- Vortex REax Top, Heidolph (Nemecko)
- Zostava HPLC/UV-VIS – Thermo Fisher Scientific (USA):
  - Dionex UltiMate 3 000 series,
  - UV-VIS detector UlltiMate,
  - Pump UlltiMate,
  - Column Oven LCO 101, ECOM,
  - ERC RefractoMax 520,
  - Kolóna Kinetex 2,6 μm F5 (150 × 4,6 mm).

## **4.2 Špecifikácia použitých rastlinných extraktov**

### **4.2.1 Príprava extraktov pre analýzu**

K jednotlivým experimentom a stanoveniam boli pripravené vodné, etanolové a hexánové extrakty vybraných vzoriek v závislosti na ich charakter.

Pre prípravu vodných a etanolových extraktov bola použitá navážka 2 g vzorky a 20 ml rozpúšťadla (destilovaná voda a 20% etanol). V prípade brusnicovej a čučoriedkovej koncentrovanej šťavy 4 ml vzorky a 20 ml rozpúšťadla. Vzorky boli následne 24 hodín inkubované pri teplote 37 °C v danom rozpúšťadle a po uplynutí 24 hodín bola odstránená pevná zložka filtráciou cez gázu a centrifugáciou po dobu 5 minút pri 10 000 ot./min. a k ďalším experimentom bol ponechaný len tekutý extrakt, resp. supernatant.

Pri príprave olejov z vybraných rastlinných materiálov extrakciou hexánom bol využitý automatizovaný Soxhletov extraktor „Soxtherm“. Samotný cyklus trval 3 hod. 4 min. a prístroj bol nastavený podľa parametrov uvedených v tabuľke 7. Extrakcia pomocou Soxthermu je názorne zobrazená na obrázku 12. Po skončení extrakcie boli zvyšky hexánu odparené pomocou rotačnej vákuovej odparky, výťažky rozpustené v chloroforme a po odparení chloroformu získané olejové frakcie ďalej skladované. Pred jednotlivými analýzami boli určité navážky olejových extraktov počas 24 hodín za neustáleho pretrepávania na trepačke pri laboratórnej teplote rozpustené v 1 ml dimetylsulfoxidu.

Tab. 7: Parametre softvéru prístroja Soxtherm

T-classification	300 °C	Evaporation A	5 × Interval
Extraction Temperature	170 °C	Extraction Time	1h 0min
Reduction Interval	3min 30s	Evaporation B	2 × Interval
Reduction Pulse	3s	Evaporation C	10 min
Hot Extraction	1h 30min	Program Length	3h 4min



Obr. 12: Príprava hexánových extraktov pomocou prístroja Soxtherm (zľava: zázvor, harmanček, mäta, ľan)

#### 4.2.2 Stanovenie celkového obsahu fenolických zlúčenín

Ako štandard pre kalibráciu bola použitá kyselina gallová, takže získané výsledky je možné vyhodnotiť ako ekvivalentné množstvo kyseliny gallovej (GAE). Z roztoku kyseliny gallovej o koncentrácii 1 g/l bolo pripravených sedem kalibračných roztokov v rozmedzí koncentrácií 0,1–0,7 mg/ml. Z každého z týchto pripravených roztokov bolo do čistých a suchých skúmaviek následne odobraných 50 µl, k nim bol pridaný 1 ml vody a 1 ml Folin-Ciocalteuovho činidla vopred zriedeného destilovanou vodou v pomere 1 : 9. Všetky skúmavky boli premiešané pomocou prístroja Vortex a po 5-minútovej inkubácii pri laboratórnej teplote bol do nich pridaný 1 ml nasýteného roztoku uhličitanu sodného. Roztoky boli opäť premiešané a po 15 minútach bola spektrofotometricky zmeraná absorbancia pripravených roztokov pri vlnovej dĺžke 750 nm. Ako blank bol použitý roztok pripravený rovnako ako kalibračné roztoky, len namiesto štandardného roztoku kyseliny gallovej bola použitá destilovaná voda.

Pri vlastnom stanovení bolo z extraktov pripravených podľa postupu v kapitole 4.2.1 odpipetovaných 50 µl a ďalší postup bol analogický ako v prípade merania kalibračnej závislosti. Každá vzorka bola pripravená v triplikátoch pre zminimalizovanie chyby merania, z ktorých bol vypočítaný priemer a smerodajná odchýlka. Blanky boli pripravené s daným rozpúšťadlom.

Koncentrácia celkového obsahu fenolických zlúčenín bola stanovovaná na základe rovnice lineárnej regresnej analýzy kalibračných roztokov kyseliny gallovej  $A_{750} = 1,7523 \cdot c$  s korelačným koeficientom  $R^2 = 0,9978$ .

#### 4.2.3 Stanovenie celkových flavonoidov

Zo štandardného roztoku katechínu o koncentrácii 1 g/l bolo pripravených sedem kalibračných roztokov v rozmedzí koncentrácií 0,05–0,3 mg/ml. Z každého z týchto pripravených roztokov bolo následne odpipetovaných 0,5 ml, k nim bol pridaný 1,5 ml vody a 0,2 ml 5% roztoku  $\text{NaNO}_2$ . Všetky skúmvky boli premiešané pomocou prístroja Vortex a po 5 minútach bolo do nich pridaných 0,2 ml 10% roztoku  $\text{AlCl}_3$ . Následne boli roztoky opäť zhomogenizované a po ďalších 5 minútach bolo do nich pridaných 1,5 ml 1M roztoku  $\text{NaOH}$  a 1 ml vody. Roztoky boli opäť premiešané. Po 15 minútach bola spektrofotometricky zmeraná absorbancia pripravených roztokov pri vlnovej dĺžke 510 nm. Ako blank bol použitý roztok pripravený rovnako ako kalibračné roztoky len namiesto katechínu bola použitá destilovaná voda.

Jednotlivé extrakty boli testované analogicky ako v prípade merania kalibračnej závislosti, kde namiesto katechínu bolo pridaných 0,5 ml vzoriek. Každá vzorka bola pripravená v triplikátoch, z ktorých bol vypočítaný priemer a smerodajná odchýlka. Blanky boli pripravené s rozpúšťadlom.

Koncentrácia celkových flavonoidov bola stanovovaná na základe rovnice lineárnej regresnej analýzy kalibračných roztokov katechínu  $A_{510} = 3,0442 \cdot c$  s korelačným koeficientom  $R^2 = 0,9997$ .

#### 4.2.4 Stanovenie jednotlivých flavonoidov metódou RP-HPLC s UV-VIS detekciou

Pre stanovenie boli použité nasledujúce štandardy: aloenín A, apigenín, daidzeín, epikatechín, floridzín, hesperidín, katechín, kvercitrín-3-glukozid, kyselina gallová, kyselina chlorogénová, kyselina kávová, kyselina kumarová a pelargonidín-3-glukozid chlorid. Vzorky pre samotnú analýzu boli pripravené tak, že k 1 ml vodných extraktov jednotlivých vzoriek bol pridaný 1 ml hexánu a následne 2 ml 70% metanolu (riedeného Mili-Q vodou). Po pretrepaní zmesi bola odobraná vodná frakcia a 5× nariedená demineralizovanou Mili-Q vodou. Takto pripravené vzorky boli prefiltrované cez nylonový filter (0,45 µm) do vialiek, ktoré boli umiestnené do autosampléru HPLC.

Nástreky pripravených vzoriek štandardov a extraktov o objeme 20 µl boli analyzované metódou RP-HPLC/UV-VIS na kolóne Kinetex F5 pri 35 °C a prietoku 0,4 ml/min po dobu 30 minút. Bola využitá gradientová elúcia mobilnej fázy, kedy sa pomer zložiek mobilnej fázy Mili-Q voda : acetonitril menil z 90 : 10 na 30 : 70. Detekcia bola prevedená spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 260 a 280 nm. Namerané dáta boli analyzované pomocou softvéru „Chromleon“.

Výsledné rovnice kalibračných kriviek, použité pri stanovovaní vybraných flavonoidov v jednotlivých vzorkách, sú uvedené v tabuľke 8.

Tab. 8: Rovnice kalibračných kriviek [mg/ml]

<b>Aloenín A:</b>	$A = 317,4 \cdot c$	<b>Kyselina gallová:</b>	$A = 5315,7 \cdot c$
<b>Apigenín:</b>	$A = 381,4 \cdot c$	<b>Kyselina chlorogénová:</b>	$A = 639,47 \cdot c$
<b>Epikatechín:</b>	$A = 1154 \cdot c$	<b>Kyselina kávová:</b>	$A = 2047,2 \cdot c$
<b>Floridzín:</b>	$A = 3605,7 \cdot c$	<b>Kyselina kumarová:</b>	$A = 4962,2 \cdot c$
<b>Hesperidín:</b>	$A = 3246,3 \cdot c$	<b>Pelargonidín-3-glukozid chlorid:</b>	$A = 6535 \cdot c$
<b>Kvercitrín-3-glukozid:</b>	$A = 19347 \cdot c$		

#### 4.2.5 Stanovenie celkových karotenoidov

Pre stanovenie množstva celkových karotenoidov v jednotlivých vzorkách pripravených podľa návodu v kapitole 4.2.1, bolo vždy najskôr premerané absorpčné spektrum pri vlnových dĺžkach 290–500 nm. Z nameraných spektier bol následne vypočítaný celkový obsah karotenoidov na základe kalibračnej závislosti absorbancie pri 445 nm na koncentrácii štandardu  $\beta$ -karoténu. Rovnica lineárnej regresnej analýzy kalibračných roztokov  $\beta$ -karoténu bola stanovená ako  $A_{445} = 0,0904 \cdot c$  s korelačným koeficientom  $R^2 = 0,9901$ . Jednotlivé roztoky boli v prípade potreby riedené acetónom, ktorý bol použitý i ako blank pri spektrofotometrickom meraní.

#### 4.2.6 Stanovenie antioxidačnej aktivity

Pri stanovovaní antioxidačnej aktivity bola využitá jedna zo základných spektrofotometrických metód determinácie antioxidačnej účinnosti daných extraktov – metóda TEAC využívajúca ABTS<sup>•+</sup>. Najskôr bol pripravený roztok ABTS<sup>•+</sup>, ktorý bol rozpustený vo vode na koncentráciu 7 mmol/l. Následne bol do neho pridaný K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> do dosiahnutia koncentrácie 2,45 mmol/l. Pripravený roztok bol ponechaný odstáť minimálne 12 hodín v tme. Pred samotným spektrofotometrickým meraním bol tento roztok ešte nariadený 99,8% etanolom na výslednú absorbanciu  $A = 0,7 \pm 0,02$  pri vlnovej dĺžke 734 nm. Potom bola stanovená východisková absorbancia daného roztoku  $A_0$ , pričom bolo do 1 ml zriedeného ABTS<sup>•+</sup> pridaných 10  $\mu$ l rozpúšťadla (tj. destilovaná voda a 20% etanol).

Kalibrácia sa prevádzala pomocou kalibračnej rady roztoku TROLOX-u pripraveného rozpustením v 60% etanole. Z tohto zásobného roztoku bolo pripravených osem roztokov o vzostupných hodnotách koncentrácií v rozmedzí 50–400  $\mu$ g/ml. Do zúženej kyvety potom bolo napipetovaných 10  $\mu$ l týchto kalibračných roztokov a 1 ml zriedeného ABTS<sup>•+</sup>, zmes bola premiešaná a ponechaná 10 minút v tme. Následne bola zmeraná absorbancia pri vlnovej dĺžke 734 nm. Do kalibračnej závislosti boli vynášané hodnoty rozdielu počiatočnej absorbancie  $A_0$  a absorbancií nameraných po 10 minútach reagovania vzorky s roztokom ABTS v tme.

Pri vlastnom stanovení bolo zo vzoriek pripravených podľa kapitoly 4.2.1 odpipetovaných 10  $\mu$ l, zmiešaných s 1 ml zriedeného roztoku ABTS<sup>•+</sup>. Zmes bola premiešaná, ponechaná 10 minút v tme a premeraná absorbancia triplikátov pri 734 nm. Z nich bol spočítaný priemer a smerodajné odchýlky. Ekvivalentné množstvo TROLOX-u, ktorým bola determinovaná antioxidačná aktivita u jednotlivých vzoriek, bolo prepočítané na základe rovnice lineárnej regresnej analýzy rozdielov absorbancií kalibračných roztokov TROLOX-u, konkrétne  $A = 1,4335 \cdot c$  s korelačným koeficientom  $R^2 = 0,9999$ .

### 4.3 Kultivácia probiotických baktérií

Pre kultiváciu baktérií *Bifidobacterium breve* CCM 7825<sup>T</sup> a *Lactobacillus casei* CCM 4798 bol použitý komerčne dostupný MRS bujón obsahujúci peptón, hovädzí extrakt, kvasničný extrakt a glukózu. Podľa výrobcu stanoveného pomeru bolo v Erlenmeyerovej banke médium rozmiešané v destilovanej vode (55,15 g na 1 000 ml). Samotná sterilácia média prebiehala 30 minút v tlakovom hrnci s otvoreným ventilom. Následne bolo médium v sterilnom boxe rozdelené do plastových skúmaviek o objeme 15 ml a zaočkované 1 ml probiotickej kultúry uchováanej v kryoskúmavkách. Pri práci s probiotickými baktériami bolo potrebné minimalizovať ich kontakt so vzduchom. Takto pripravené kultúry boli následne inkubované 24 hodín v termostate pri teplote 37 °C a po inkubácii ďalej spracovávané.

### 4.4 Priama interakcia rastlinných extraktov s probiotikami

Do jamôk 96-jamkovej mikrotitračnej doštičky bolo postupne nanosených 230  $\mu$ l MRS tekutého média; 75  $\mu$ l bakteriálnej kultúry (pripravenej podľa návodu v kapitole 4.3) a 25  $\mu$ l jednotlivých extraktov (pripravených podľa kapitoly 4.2.1). Zároveň boli pripravené i referenčné kontrolné vzorky, v ktorých bolo k bakteriálnej kultúre pridaných 25  $\mu$ l daného rozpúšťadla. Ako blanky použitých extraktov slúžili



jamky naplnené 305 µl vody miesto bakteriálnych buniek a 25 µl danej látky.

Rast baktérií v podobe zmeny zákalu bol meraný v čase 0 a po 24 hodinách pomocou prístroja ELISA Reader pri 630 nm. Ako referenčná vzorka slúžila hodnota zmeny absorbancie s prídavkom rozpúšťadla namiesto vzorky extraktu. Následne bol z rozdielu absorbancií vyhodnotený nárast alebo naopak úbytok bakteriálnych buniek. Na základe tohto testu boli vybrané vzorky, ktoré neinhibujú rast probiotických baktérií. Počet buniek bol prepočítaný na základe kalibračnej závislosti absorbancie pri 630 nm na počte bakteriálnych buniek stanovených nepriamou kultivačnou metódou, konkrétne: počet buniek =  $\frac{A_{630} - 0,0957}{4 \cdot 10^{-10}}$ .<sup>352</sup>

## 4.5 Modelové trávenie zmesí obsahujúcich kombináciu extraktov a probiotík

### 4.5.1 Príprava modelových tráviacich štiav

K simulácii prechodu pripravených kombinácií probiotík s prírodnými extraktmi tráviacim traktom a stanoveniu ich viability v jednotlivých úsekoch tráviacej sústavy boli pripravené modelové tráviace šťavy podľa nasledujúcich postupov.<sup>332</sup>

#### 4.5.1.1 Modelová žalúdočná šťava

Pre prípravu žalúdočnej šťavy bolo v 100 ml destilovanej vody rozpustených 0,25 g pepsínu. Následne bolo pridaných 0,84 ml 35% kyseliny chlorovodíkovej. Výsledné pH roztoku bolo upravené na hodnotu 0,9.

#### 4.5.1.2 Modelová pankreatická šťava

Pankreatická šťava bola pripravená rozpustením 0,25 g pankreatínu a 1,5 g NaHCO<sub>3</sub> v 100 ml destilovanej vody, pričom pH roztoku bolo upravené na hodnotu 8,9.

#### 4.5.1.3 Modelová žľčová šťava

Žľčová šťava bola pripravená pridaním 0,8 g žľčových solí do 200 ml fosfátového pufru o pH 8.

### 4.5.2 Stanovenie viability buniek počas trávenia pomocou zákalu

Probiotické kultúry pripravené podľa návodu v kapitole 4.3 boli najskôr scentrifugované pri 5 000 otáčkach po dobu 5 minút. Supernatant bol zliaty a pelet buniek rozsuspendovaný v 10 ml sterilnej vody. Postup premytia bol ešte raz zopakovaný. Bunkové suspenzie, vzniknuté rozsuspendovaním peletu oboch probiotických kultúr v 10 ml sterilnej vody, boli po 0,5 ml pridané k 4,5 ml jednotlivých rastlinných extraktov. V prípade referenčnej vzorky bolo použitých 4,5 ml daného rozpúšťadla, tj. vody, 20% etanolu a DMSO.

Po premiešaní zmesí a uplynutí 15 minút inkubácie pri laboratórnej teplote bol zo zmesí odobraný 1 ml k ďalším analýzám. Predstavoval sériu vzoriek pred pôsobením tráviacich štiav. K zvyšným roztokom boli pridané 4 ml žalúdočnej šťavy. Po 30 minútach inkubácie pri 37 °C bol opäť z jednotlivých zmesí odobraný 1 ml na analýzu a k zvyšku bolo pridaných 3,5 ml pankreatickej a 3,5 ml žľčovej šťavy. Takto pripravená zmes bola ponechaná 90 minút inkubovať na temperovanej trepačke pri 37 °C.

Po ukončení modelového trávenia boli vzorky scentrifugované pri 5 000 otáčkach po dobu 5 minút. Supernatant bol zliaty a pelet rozsuspendovaný v 5 ml sterilnej vody a pripravený pre ďalšie stanovenia. Všetky vzorky určené k analýze boli potom v triplikátoch nanosené na 96-jamkové mikrotitračné doštičky; vždy 30 µl danej vzorky a 300 µl čistého MRS média. Obdobne ako v kapitole 4.4 bol nárast baktérií stanovovaný pomocou rozdielu zákalu nameraného ELISA Reader-om pri 630 nm v čase 0 a 24 hodín.

## 4.6 Testovanie extraktov na ľudských črevných epiteliálnych bunkách *in vitro*

### 4.6.1 Kultivácia bunkovej línie CaCo-2

Bunková línia bola dlhodobo uchovávaná zamrazená v špeciálnych skúmavkách s kryoprotektívom. Pri rozmrazení boli skúmavky rozohriate v dlani a následne bunky prenesené do centrifugálnej skúmavky s PBS pufrom. Suspenzie boli scentrifugované (5 minút, 230 RCF), supernatant odliaty, bunky rozsuspendované v 5 ml média a prenesené do kultivačnej nádoby s povrchovou plochou 75 cm<sup>2</sup>, ktorá bola médiom doplnená na potrebný objem 15 ml. Kompletné živné médium pre túto bunkovú líniu tvorí komerčne dostupné bazálne médium Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) obohatené o 2mM glutamín, 1% zmes neesenciálnych aminokyselín (NEAA), 10% fetálne bovinné sérum (FBS) a 1% roztok antibiotík. Následne bola kultúra prvý i druhý deň po rozmrazení prekontrolovaná pod mikroskopom a uchovávaná v termostate pri 37 °C s 5% obsahom CO<sub>2</sub> a 95% vlhkosťou.

Kultivačné médium bolo menené podľa potreby 2–3 razy týždenne a nahradené 15 ml čerstvého média. Pasážovanie bolo prevádzané pri dosiahnutí 70–80% konfluencie. Bunky boli v kultivačných nádobách vytiahnuté z CO<sub>2</sub> kultivačného boxu a pod inverzným mikroskopom skontrolovaná konfluencia, adherencia a prípadná kontaminácia. Následne boli prenesené do laminárneho boxu. Najskôr bolo opatrne odstránené médium, potom boli bunky 2 až 3 razy prepláchnuté sterilným PBS pufrom (cca 5 ml). Po prepláchnutí bola aplikovaná zmes 0,25% trypsínu a 0,53mM EDTA. Po úplnom uvoľnení prisadnutých buniek bolo pridaných 5 ml EMEM média, bunky boli prenesené do centrifugálnych skúmaviek a scentrifugované (2–5 min, 300 RCF). Supernatant bol zliaty, pelet buniek rozsuspendovaný v približne 5 ml kompletného média. Bunková suspenzia bola prenesená do kultivačných nádob a doplnená čerstvým médiom so sérom do potrebného objemu.

### 4.6.2 MTT test

#### 4.6.2.1 Počítanie buniek a výpočet potrebného množstva buniek na MTT test

Bunky boli po vytiahnutí z kultivačného boxu najskôr skontrolované pod inverzným mikroskopom a prenesené do laminárneho boxu. Médium z kultivačnej nádoby bolo odstránené a následne boli pridané 2 ml roztoku trypsín-EDTA. Roztok pôsobil po dobu než sa bunky uvoľnili odo dna (približne 3 minúty), potom boli bunky preliate do cca 4 ml média so sérom (objem dvojnásobne väčší oproti trypsínu), čím došlo k inhibícii trypsínu. Vzniknutá suspenzia bola prenesená do 15 ml skúmavky a pipetou jemne homogenizovaná. Následne bolo do mikroskúpavky odobraných 10 µl bunkovej suspenzie, k nej bol pridaný rovnaký objem, tj. 10 µl trypanovej modrej a opäť jemne pipetou premiešané. Toto farbivo farbí mŕtve bunky modro a živé bunky sa vyznačujú bielym okrajom. 10 µl takto pripravenej zmesi bolo nanosených na každú stranu Bürkerovej komôrky a za pomoci mikroskopu boli spočítané bunky. V prípade, že nebolo možné bunky pre veľký počet spočítať, bola pôvodná suspenzia nariedená PBS roztokom a postup bol zopakovaný. Týmto spôsobom bol stanovený počet buniek v 1 ml pôvodnej bunkovej suspenzie.

Na samotný MTT test je potrebných 100 µl média s koncentráciou  $1,5 \cdot 10^4$  buniek na jednu jamku mikrotitračnej doštičky. Na jednej doštičke je možné využiť až 60 jamiiek, avšak je potrebné pri príprave jednotlivých zložiek počítat s rezervou, tj. 65. To znamená, že na jednu doštičku je potrebné 6 500 µl média obsahujúceho  $1,3 \cdot 10^6$  buniek. Podľa koncentrácie v pôvodnej bunkovej suspenzii, zistenej podľa vyššie uvedeného návodu, boli vzorky vhodne nariedené.

#### 4.6.2.2 Príprava testovaných extraktov a kontrolných vzoriek

Pripravené vzorky extraktov boli v sterilnom prostredí prefiltrované pomocou bakteriologického filtru (25 mm 0,2 µm PES VWR [514-0073]), čím sa zamedzilo prípadnej kontaminácii. Sterilné vzorky boli potom riedené médiom na požadované koncentrácie (tabuľka 9) a premiešané pomocou vortexu. Podobne boli pripravené i sterilné kontrolné vzorky (tabuľka 10). U vzoriek extraktov bolo zmerané pH.

Tab. 9: Ukážka riedenia pre vzorky extraktov

<b>Koncentrácia vzorky [%]</b>	4	8	12	16	20	24	28
<b>Objem vzorky [μl]</b>	20	40	60	80	100	120	140
<b>Objem média [μl]</b>	480	460	440	420	400	380	360

Tab. 10: Riedenie kontrol

<b>Typ kontroly</b>	<b>Vc</b>	<b>EtOH</b>	<b>Cc</b>
<b>Objem kontroly [μl]</b>	280	400	0
<b>Objem média [μl]</b>	720	600	1 000

#### 4.6.2.3 Prevedenie MTT testu

Pripravená bunková suspenzia bola pipetovaná po 100 μl na 96-jamkovú doštičku. Do krajných jamiek bolo napipetovaných 100 μl PBS pufri, aby sa zabránilo vysychaniu média. Bunky na doštičke boli skontrolované pomocou mikroskopu a uložené do termostatu. Po uplynutí 24 hodín bolo z jamiek odpipetované médium a pridaných 100 μl vzoriek a kontrol (tabuľka 11). Takto pripravená doštička bola vrátená opäť na 24 hodín do termostatu. Potom boli jednotlivé vzorky odpipetované a do každej jamky bolo pridaných 20 μl MTT v PBS o koncentrácii 2,5 mg/ml. Bunky boli inkubované 3 hodiny v termostate a následne bolo po odobraní vzoriek do jamiek pridaných 100 μl 10% SDS v PBS. Doštička bola obalená alobalom a ponechaná v tme pri laboratórnej teplote ďalších 24 hodín. Po uplynutí tejto doby bola pomocou prístroju ELISA Reader zmeraná absorbancia pri vlnovej dĺžke 562 nm.

Tab. 11: Schéma nanášania vzoriek na 96-jamkovú mikrotitračnú doštičku

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
B	PBS	Cc	4%	8%	12%	16%	20%	24%	28%	Vc	Vc	PBS
C	PBS	Cc	4%	8%	12%	16%	20%	24%	28%	Vc	Vc	PBS
D	PBS	Cc	4%	8%	12%	16%	20%	24%	28%	Vc	Vc	PBS
E	PBS	Cc	4%	8%	12%	16%	20%	24%	28%	Vc	EtOH	PBS
F	PBS	Cc	4%	8%	12%	16%	20%	24%	28%	Vc	EtOH	PBS
G	PBS	Cc	4%	8%	12%	16%	20%	24%	28%	Vc	EtOH	PBS
H	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

## 4.7 Enkapsulácia

### 4.7.1 Príprava alginátových častíc

Probiotiká *L. acidophilus* a *B. breve* určené k enkapsulácii boli 24 hodín inkubované pri 37 °C. Následne boli scentrifugované pri 5 000 otáčkach po dobu 10 minút. Supernatant bol odliaty a pelet buniek rozsuspendovaný v sterilnej destilovanej vode a opäť scentrifugovaný pri 5 000 otáčkach po dobu 10 minút. Následne bol supernatant opäť odliaty a bunky rozsuspendované v 10 ml vybraných rastlinných extraktov (vodné extrakty mäty, harmančeku a škorice). Referenčná vzorka buniek bola rozsuspendovaná v 10 ml sterilnej vody. Ku každej vzorke bolo následne pridaných 10 ml sterilného 2% roztoku alginátu sodného a zmes bola dôkladne premiešaná.

Pre samotnú prípravu alginátových častíc bol použitý enkapsulátor Büchi B-395 Pro. Veľkosť trysiek bola zvolená 1 000 μm. Vytvrdzovacím roztokom bolo 20 ml 1% roztoku CaCl<sub>2</sub>, kde boli častice ponechané 15 minút. Po uplynutí tejto doby boli častice prefiltrované a použité k ďalším testovaniam.

## 4.7.2 Stanovenie enkapsulačnej účinnosti

### 4.7.2.1 Enkapsulačná účinnosť probiotík

Z každej zmesi probiotík, extraktov a roztoku alginátu určenej k enkapsulácii bolo odobratých 10 µl a prenesených na Bürkerovu komôrku. Pomocou optického mikroskopu so zväčšením 1 000× bol spočítaný počet buniek a prepočítaný na 1 ml vzorky. Bürkerova komôrka má na svojej ploche dve mriežky, ktoré sa skladajú z väčších a menších štvorcov, príp. obdĺžnikov. Plocha u veľkých štvorcov, v ktorých bol počítaný počet buniek, činí 1/25 mm<sup>2</sup>. Hĺbka komôrky je 0,1 mm. Počet buniek v 1 ml v danej zmesi bol stanovený podľa vzorca 
$$\frac{\text{celkový počet napočítaných buniek}}{\text{počet štvorcov} \cdot \text{plocha štvorca} \cdot \text{hĺbka komôrky}}$$
.

Z vytvrdzovacieho roztoku CaCl<sub>2</sub> po skončení enkapsulácie bola tiež odobraná vzorka, ktorá bola nanosená na Bürkerovu komôrku a boli spočítané bunky uvoľnené v roztoku. Z rozdielu počtu buniek pred enkapsuláciou a počtu buniek vo vytvrdzovacom roztoku tak bolo možné určiť percento úspešne enkapsulovaných probiotických buniek. Zároveň bola kontrolovaná i kontaminácia.

### 4.7.2.2 Enkapsulačná účinnosť fenolických látok

Zo zmesí určených na enkapsuláciu a následne potom i z vytvrdzovacích roztokov použitých pri jednotlivých enkapsuláciách bolo podľa postupu v kapitole 4.2.2 stanovené celkové množstvo fenolických látok. Vzájomný rozdiel determinoval množstvo enkapsulovaných fenolov.

## 4.7.3 Stanovenie stability častíc pri prechode modelovým tráviacim traktom

### 4.7.3.1 Modelové trávenie častíc

Jednotlivé navážky častíc boli vzhľadom na svoju veľkosť najskôr mechanicky narušené, čo malo simulovať rozštiepenie častíc v ústach pred prehĺtnutím. Tráviace šťavy boli pripravené podľa postupu v kapitole 4.5.1.

K 1 g častíc bolo pridaných 5 ml žalúdočnej šťavy. Vzorky boli pri 37 °C ponechané pôsobeniu žalúdočnej šťavy po dobu 30 minút. Potom bolo pridaných 2,5 ml pankreatickej a 2,5 ml žľozovej šťavy. Tieto zmesi boli následne 90 minút inkubované na temperovanej trepačke pri teplote 37 °C. Po uplynutí doby boli odobrané vzorky analyzované. Okrem viability probiotík kultivačnou metódou bolo stanovované množstvo uvoľnených fenolických látok prevádzané podľa postupu v kapitole 4.2.2.

### 4.7.3.2 Analýza vplyvu tráviacich štiav na viabilitu enkapsulovaných probiotík

Pre nepriame stanovenie počtu buniek kultivačnou metódou bola zvolená technika zaliatím. Pre analýzu boli odobraté vzorky po skončení modelového trávenia. Odobrané vzorky (1 ml) boli nariadené desiatkovým riedením sterilnou destilovanou vodou v rozsahu riedení od 10<sup>-1</sup> až po 10<sup>-5</sup>. Vzorky s riedením 10<sup>-5</sup> boli v duplikátoch po 1 ml napipetované do Petriho misiek. Následne boli zaliaté sterilným MRS agarom o teplote 45 °C tak, aby sa vytvorila vrstva agaru o hrúbke 2–3 mm. Pevné médium bolo pripravené prídavkom agaru o koncentrácii 15 g/l ku komerčnému MRS médiu.

Po rozliatí sa agar krúživými pohybmi premiešal so vzorkou a ponechal sa na vodorovnej chladnej ploche stuhnúť. Potom boli misky kultivované dnom nahor pri teplote 37 °C a po 48 hodinách bol vyhodnotený počet narastených kolónií.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Cieľom predloženej práce bolo najskôr extrahovať z vybraných prírodných matric fytochemikálie pôsobiace protizápalovo (bližšie špecifikované v kapitole 2.4.1) a zároveň neinhibujúce životnosť probiotických baktérií, aby mohli byť spoločne koenkapsulované pre zvýšenie pozitívneho efektu na konzumenta trpiaceho chronickým zápalovým ochorením v intestinálnej oblasti tráviaceho traktu. Výstupom práce by mal byť návrh vhodnej kombinácie rastlinného extraktu s vyhovujúcimi vlastnosťami a probiotického kmeňa v optimálnej forme pre využitie v nutraceutike.

### 5.1 Charakterizácia rastlinných extraktov

Rastlinné extrakty pripravené podľa návodu v kapitole 4.2.1 mali v prípade vodných a etanolových extrakcií pomerne vysokú výťažnosť. Najväčšie straty boli v prípade extrakcie sušených bylín harmančeku a mäty, ktoré nasali extrahovadlo a bolo treba postup extrakcie obohatiť o filtráciu cez gázu pre minimalizovanie strát. V prípade extrakcie hexánom boli z 10 g navážiek rastlinného materiálu, extrahovaných 100 ml hexánu, pripravené len veľmi nízke množstvá výsledných olejov. Najväčšie množstvo bolo získané z extrakcie ľanového semienka (3,241 2 g oleja), u ostatných vzoriek výťažok nepresiahol 0,322 2 g.

#### 5.1.1 Stanovenie celkového obsahu fenolických zlúčenín

Zvolená metóda využíva Folin-Ciocalteuovo činidlo obsahujúce zmes molybdénanov a wolfrámanov, ktoré sú v prítomnosti fenolických zlúčenín redukované na ich modro sfarbené oxidy. Intenzita sfarbenia je priamo úmerná množstvu prítomných fenolov, čo je podstatou stanovenia ich koncentrácie pomocou UV-VIS spektrofotometrie.<sup>333</sup>

Výsledné hodnoty absorbancií roztokov jednotlivých extraktov rastlín s príslušnou optimalizovanou koncentráciou boli priemerované a prepočítané na obsah fenolických zložiek v 1 grame danej rastliny, prípadne v 1 grame získaného oleja získaného extrakciou hexánom. V tabuľke 12 sú zhrnuté vypočítané hodnoty.

Tab. 12: Celkový obsah fenolických zlúčenín v pripravených extraktoch

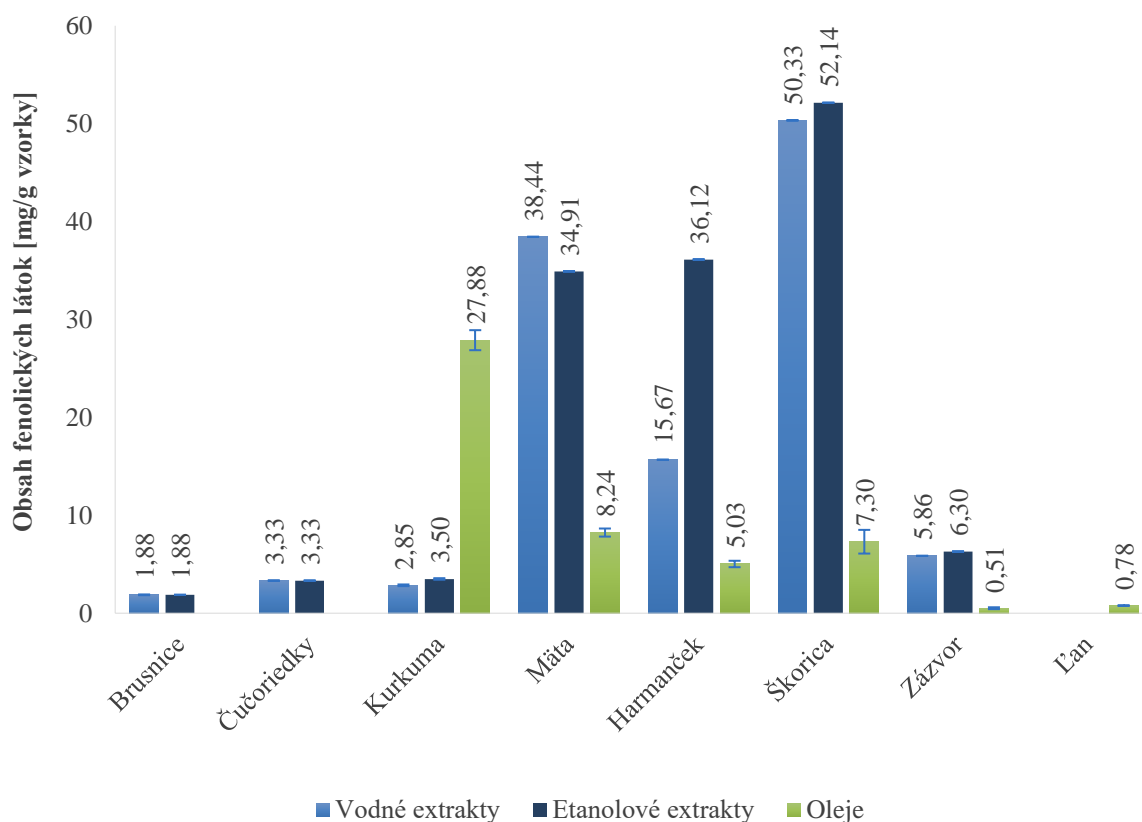
Vzorka	Vodné extrakty [mg/g vzorky]	Etanolové extrakty [mg/g vzorky]	Olejové extrakty [mg/g oleja]
<b>Brusnice</b>	1,88 ± 0,04	1,88 ± 0,01	-
<b>Čučoriedky</b>	3,33 ± 0,01	3,33 ± 0,00	-
<b>Kurkuma</b>	2,85 ± 0,09	3,50 ± 0,08	27,88 ± 1,02
<b>Mäta</b>	38,44 ± 0,02	34,91 ± 0,01	8,24 ± 0,41
<b>Harmanček</b>	15,67 ± 0,01	36,12 ± 0,02	5,03 ± 0,33
<b>Škorica</b>	50,33 ± 0,01	52,14 ± 0,02	7,30 ± 1,21
<b>Zázvor</b>	5,86 ± 0,00	6,30 ± 0,01	0,51 ± 0,10
<b>Ľan</b>	-	-	0,78 ± 0,01

Z grafického znázornenia množstva fenolov v daných extraktoch (obrázok 13) je patrné, že vysoké obsahy vykazovali najmä vodné a etanolové extrakty mäty, harmančeku a škorice. Vodné a etanolové extrakty pripravené z brusnicovej a čučoriedkovej šťavy spolu s kurkumou obsahujú signifikantne nižšie množstvo fenolických zložiek. Určitý rozdiel v množstve fenolov mohol vzniknúť pri príprave a spracovaní štiav. U kurkumy zohráva rolu hydrofóbny charakter jej významnej fenolickej zlúčeniny kurkumínu, ktorý sa do polárnych rozpúšťadiel vody a etanolu extrahoval len v nízkych koncentráciách.

Z tohto dôvodu dosiahol najvyššiu hodnotu spomedzi olejových vzoriek olej z kurkumy. S približne tretinovými obsahmi za ním nasledovali mäťový, škoricový a harmančekový olej a ako posledné v obsahu fenolických látok sa preukázali zázvorový a ľanový olej.

V prípade harmančekových extraktov má na obsah extrahovaných fenolov značný vplyv rozpúšťadlo. Etanol sa preukázal v tomto prípade efektívnejší ako voda. U ostatných vzoriek je rozdiel v účinnosti medzi vodou a 20% etanolom len veľmi nízky.

Je zaujímavé porovnávať obsah fenolických látok po extrakcii vodou, príp. 20% etanolom, oproti olejom extrahovaným hexánom. Hoci v prípade olejových extraktov je stanovenie prepočítané na gram získaného oleja, nie na pôvodnú navážku byliny, stále je vo väčšine prípadov viditeľný značný pokles. S tepelným spracovaním klesá vo všeobecnosti ako antioxidačná aktivita, tak i obsah fenolických zložiek.<sup>334</sup> Preto v prípade oleja, kedy bola vzorka extrahovaná pri teplote až 170 °C je viditeľný úbytok týchto zlúčenín v porovnaní s extraktmi vo vode a v etanole, kde najvyššia teplota pri extrakcii dosiahla 37 °C. Ďalším dôležitým faktorom je schopnosť hexánu extrahovať najmä lipofilné zložky, pričom fenolické látky majú prevažne hydrofilný charakter.



Obr. 13: Celkový obsah fenolických látok v extraktoch vybraných rastlín

### 5.1.2 Stanovenie celkových flavonoidov

Princíp stanovenia celkových flavonoidov spočíva v spektrofotometrickej analýze oranžového sfarbenia oranžovočervených komplexov vznikajúcich reakciou chloridu hlinitého s keto- a hydroxyskupinou flavonoidov. Intenzita odpovedá množstvu prítomných flavonoidov a je spektrofotometricky determinovateľná pri vlnovej dĺžke 510 nm.<sup>335</sup>

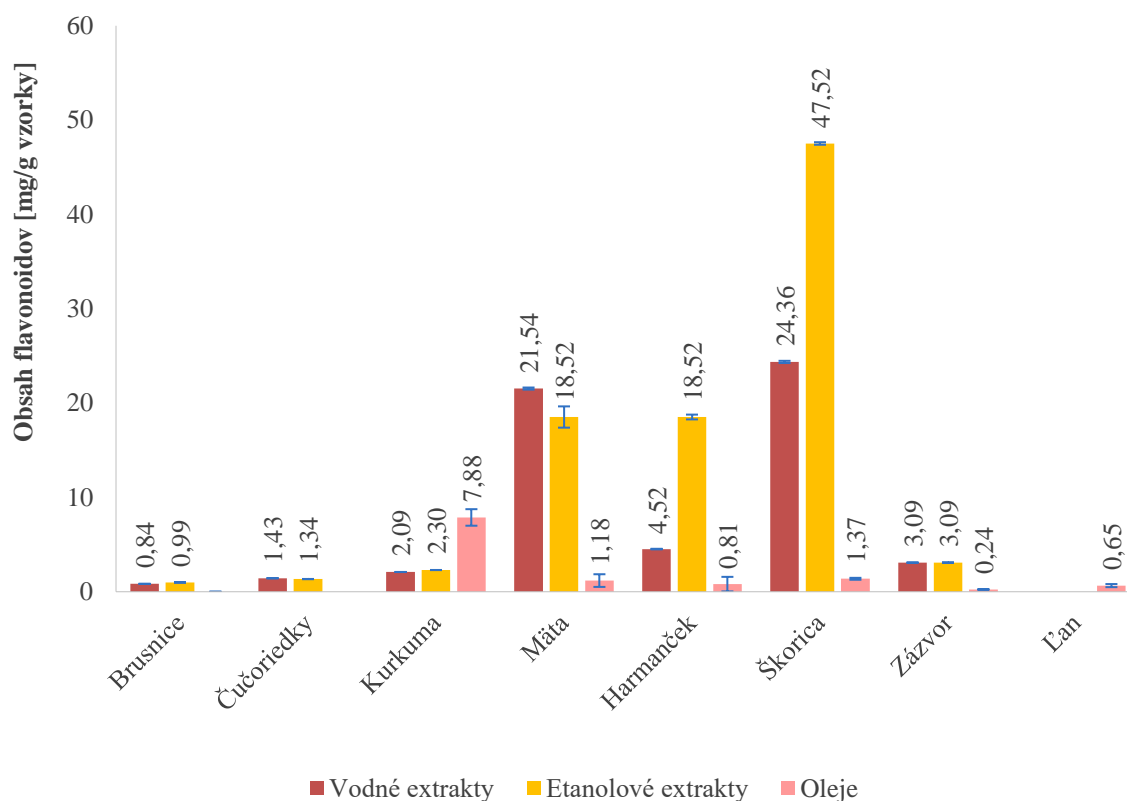
Výsledné hodnoty absorbiancií roztokov jednotlivých druhov extraktov rastlín s príslušnou optimalizovanou koncentráciou boli spriemerované a prepočítané na hmotnosť flavonoidov v 1 grame danej rastliny, prípadne v 1 grame oleja získaného extrakciou hexánom. V tabuľke 13 sú zhrnuté vypočítané hodnoty a v grafe na obrázku 14 názorne graficky zobrazené.

Tab. 13: Obsah celkových flavonoidov v pripravených extraktoch

Vzorka	Vodné extrakty [mg/g vzorky]	Etanolové extrakty [mg/g vzorky]	Olejové extrakty [mg/g oleja]
Brusnice	0,84 ± 0,00	0,99 ± 0,01	-
Čučoriedky	1,43 ± 0,00	1,34 ± 0,01	-
Kurkuma	2,09 ± 0,01	2,30 ± 0,01	7,88 ± 0,88
Mäta	21,54 ± 0,11	18,52 ± 1,13	1,18 ± 0,67
Harmanček	4,52 ± 0,03	18,52 ± 0,25	0,81 ± 0,77
Škorica	24,36 ± 0,12	47,52 ± 0,14	1,37 ± 0,10
Zázvor	3,09 ± 0,02	3,09 ± 0,01	0,24 ± 0,02
Ean	-	-	0,65 ± 0,16

Pri porovnaní výsledných hodnôt celkového obsahu fenolických látok a flavonoidov je vidieť, že vo väčšine prípadov tvoria flavonoidy ako podskupina fenolických molekúl viac ako polovicu. Opäť najvyššie množstvo obsahujú extrakty škorice, harmančeka a mäty. U harmančeka a škorice je pozorovateľná signifikantná výhoda použitia 20% etanolu ako extrakčného činidla flavonoidov. U škorice sa spomedzi flavonoidov predpokladá najvyššie zastúpenie kvercetínu, kvercitrínu a kempferolu. Tieto látky boli preukázané ako protizápalovo pôsobiace fytochemikálie.

Oleje nasledovali podobný trend v prípade flavonoidov ako pri fenoloch – opäť s výnimkou kurkumy výrazne nižší obsah v porovnaní s vodnými a etanolovými vzorkami. Najvyššiu hodnotu flavonoidov dosiahol olej extrahovaný z kurkumy, potom škorice, mäty, harmančeka a nakoniec zázvorový a ľanový olej.



Obr. 14: Obsah flavonoidov v extraktoch vybraných rastlín

### 5.1.3 Stanovenie vybraných flavonoidov pomocou RP-HPLC/UV-VIS

Pre identifikáciu a vyjadrenie množstva niekoľkých zástupných druhov flavonoidov bola zvolená analytická metóda RP-HPLC s UV-VIS detekciou.

Z rovníc kalibračných kriviek uvedených v kapitole 4.2.4 (tabuľka 8), bol vypočítaný obsah detegovaných flavonoidov u vzorky vodného roztoku brusníc, mäty a harmančeka (tabuľka 14). Ukážka chromatogramu pre vodný extrakt brusníc sa nachádza v prílohe 1.

Tab. 14: Identifikácia a stanovenie koncentrácie flavonoidov u vodných extraktov brusníc, mäty a harmančeka (N – nedetegované)

Názov flavonoidu	Brusnice [µg/g vzorky]	Mäta [µg/g vzorky]	Harmanček [µg/g vzorky]
Aloenin A	N	1130,32	N
Apigenín	36,86	N	552,79
Epikatechín	N	N	388,80
Floridzín	N	N	31,00
Hesperidín	N	66,26	N
Kvercitrín-3-glukozid	N	N	9,83
Kyselina gallová	29,11	822,02	780,76
Kyselina chlorogenová	N	N	1 340,63
Kyselina kávová	77,80	N	1 223,33
Kyselina kumarová	45,55	49,05	26,27
Pelargonidín-3-glukozid	N	21,31	N

V extrakte mäťových lístkov bol zistený vysoký obsah látky aloenínu A. Táto bioaktívna zlúčenina vykazuje protizápalové vlastnosti,<sup>336</sup> má pozitívny vplyv na črevné epiteliálne bunky a dokonca má potenciál chemoprotektívnej látky pri prevencii kancerogenézy.<sup>337, 338</sup> Robí tak mäťový extrakt veľmi zaujímavým pre účely tejto práce. Okrem toho sa v mäťovom extrakte objavil aj flavonoid hesperidín, ktorého terapeutický význam pri liečbe IBD bol opísaný už v kapitole 2.4.2.

U všetkých troch vzoriek bola detegovaná kyselina gallová s významným zastúpením vo vodných extraktach mäty a harmančeka. Mnoho štúdií dokladá jej potenciálne klinicky využiteľné antioxidačné, protinádorové, kardio- a neuroprotektívne vlastnosti. Zatiaľ však chýbajú potvrdzujúce klinické testy.<sup>339</sup> Ďalšou látkou nachádzajúcou sa u všetkých troch extraktov bola kyselina kumarová. Koncentrácia dosahovala u brusníc a mäty takmer dvojnásobok množstva v extrakte harmančeka. Kyselina kumarová vykazuje baktericídne účinky u množstva patogénnych baktérií (napr. *Shigella dysenteriae*).<sup>340</sup> Táto vlastnosť by mohla byť využitá k inhibícii nežiadúcich druhov v prípade dysbiózy tráviaceho traktu. Prevedené *in vitro* testy na zvieracích modeloch potvrdili i protizápalový a imunomodulačný efekt tejto látky.<sup>341</sup>

U extraktov brusníc a harmančeka boli detegované podobné zlúčeniny, avšak kvantitatívne, ale i kvalitatívne, bolo ich zastúpenie niekoľkonásobne vyššie u harmančeka. Apigenín je preukázateľne významnou protizápalovo pôsobiacou látkou, nachádzajúcou široké uplatnenie vo farmakologickom priemysle.<sup>342</sup> Podobne je na tom i epikatechín a floridzín.<sup>343, 344</sup>

Za povšimnutie stojí vysoký obsah chlorogenovej a kávovej kyseliny v harmančekovom extrakte, hoci ich typickým zdrojom v potrave je hlavne káva. Kyselina chlorogenová pôsobí protizápalovo a antioxidačne, a stáva sa tak možnou alternatívou v liečbe a prevencii chronických zápalových ochorení.<sup>345</sup> Ďalšia štúdia odhalila možné prebiotické vlastnosti tejto látky, keďže je v hrubom čreve využiteľná predovšetkým probiotickými baktériami rodu *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*.<sup>346</sup>

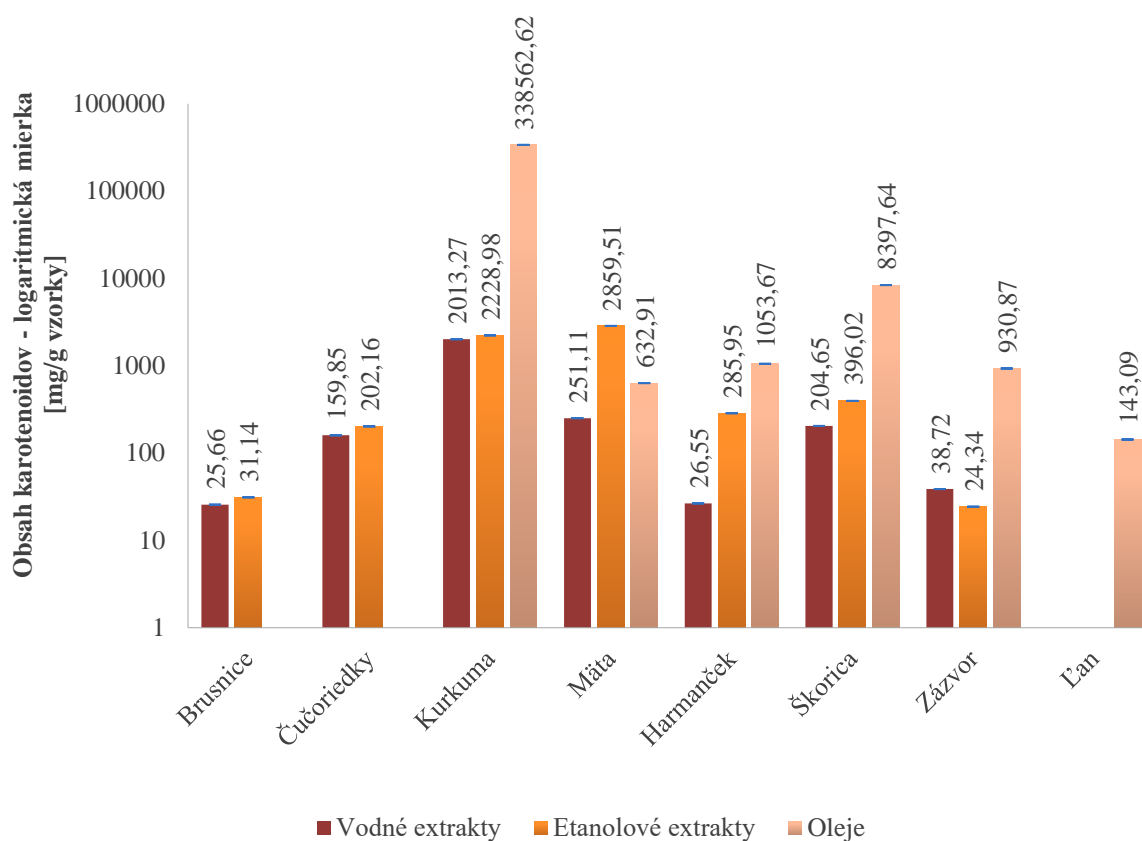


### 5.1.4 Stanovenie celkových karotenoidov

Karotenoidy boli u jednotlivých vzoriek po vhodnom nariadení acetónom stanovené ako ekvivalentné množstvo  $\beta$ -karoténu pri vlnovej dĺžke 445 nm. Výsledné hodnoty sú uvedené v tabuľke 15 a graficky znázornené na obrázku 15.

Tab. 15: Obsah celkových karotenoidov ako ekvivalentu  $\beta$ -karoténu v jednotlivých extraktoch

Vzorka	Vodné extrakty [mg/g vzorky]	Etanolové extrakty [mg/g vzorky]	Olejové extrakty [mg/g oleja]
Brusnice	25,66 ± 0,17	31,14 ± 0,06	-
Čučoriedky	159,85 ± 0,58	202,16 ± 0,08	-
Kurkuma	2 013,27 ± 0,88	2 228,98 ± 0,06	338 562,62 ± 6,70
Mäta	251,11 ± 0,17	2 859,51 ± 0,06	632,91 ± 0,56
Harmanček	26,52 ± 0,28	285,95 ± 0,11	1 053,67 ± 0,00
Škorica	204,65 ± 0,06	396,02 ± 0,55	8 397,64 ± 1,01
Zázvor	38,72 ± 0,06	24,34 ± 0,11	920,21 ± 1,07
Ľan	-	-	143,09 ± 0,04



Obr. 15: Obsah celkových karotenoidov v daných extraktoch

Najvyššie hodnoty dosiahol olejový extrakt kurkumy, ale v tomto prípade môže byť výsledok skreslený. Vysokú absorbanciu mohol vykazovať v tejto oblasti i kurkumín ako typické oranžovo-žlté farbivo kurkumy s absorpčným maximom v organických rozpúšťadlách v rozmedzí 408–430 nm.<sup>347</sup> Kurkumín má hydrofóbné vlastnosti, preto sa najlepšie extrahoval do lipidických extraktov.

Pre odlišenie karotenoidov by v tomto prípade bola potrebná špecifickejšia analýza, avšak po stanovení celkového obsahu fenolických látok (tabuľka 12) sa dá predpokladať i pomerne veľké zastúpenie karotenoidov. Kombinácia fenolických zložiek a karotenoidov tak z kurkumy robí bohatý prírodný zdroj antioxidantov.

Po kurkume najvyššiu absorbanciu vykazoval olej zo škorice, kde mohol zohrávať rolu žltkastý derivát akroleínu cinnamaldehyd.

Ako sa dalo predpokladať na základe chemických vlastností, hexán ako extrakčné činidlo vo všeobecnosti vykazoval najlepšie vlastnosti pri extrakcii karotenoidov. Pre zachovanie prospešných, avšak pomerne nestabilných a na oxidáciu náchylných biologicky aktívnych látok vyskytujúcich sa v olejových extraktoch<sup>348</sup>, by mohla byť využitá napr. enkapsulácia do lipozómov.

### 5.1.5 UV-VIS spektrálna analýza

Namerané spektrá vo viditeľnej oblasti elektromagnetického žiarenia s využitím UV-VIS spektrofotometrie sú pre všetky vzorky priložené v prílohách (príloha 2). Okrem oblasti, v ktorej je svetlo absorbované karotenoidmi, boli u vzoriek viditeľné absorpčné maximá (peaky) i v iných oblastiach. Pri interpretácii je však potrebné zohľadniť niekoľko faktorov ovplyvňujúcich výsledky. Rozpúšťadlo môže interagovať s chromoforom a tak je hlavne v UV oblasti možné pozorovať absorpčné maximá rozpúšťadiel. Ďalej koncentrácia analytov nie je jednotná a štandardne kalibrovaná, preto nemožno výsledky z daných spektier kvantifikovať. Posledným významným faktorom je vplyv pH, ktoré môže u niektorých zlúčenín ovplyvniť ich elektronickú štruktúru.

U brusníc viditeľný peak v oblasti okolo 530 nm vypovedá o prítomnosti červeno-fialových farbív pravdepodobne antokyanínov. U čučoriedok je slabšie viditeľný peak v okolí 550 nm, zodpovedajúci fialovým farbivám, taktiež predovšetkým zo skupiny antokyanínov. U čučoriedok je však dôležitá konkrétna odroda, pretože dužina plodov sa môže výrazne farebne líšiť. V prípade kurkumy sa jednoznačne jedná o jej typické farbivo kurkumín, ktoré sa extrahovalo predovšetkým do olejovej vzorky. Olej z mäty extrahovaný hexánom vykazuje zaujímavé peaky vo viacerých oblastiach viditeľného svetla. Vysoké hodnoty vo vlnových dĺžkach približne 410 a 670 nm poukazuje na prítomnosť žltých a zelených farbív – chlorofylov, najmä chlorofylu a v lístkoch mäty. Sú ešte rozpoznateľné menšie peaky v oblasti, v ktorej absorbujú svetlo karotenoidy. V prípade vodných a etanolových extraktov neboli extrahované prakticky žiadne z týchto farbív. U harmančeka boli výsledky podobné ako u mäty. Zvýšenú absorbanciu pri približne 410 nm u vzoriek škorice spôsobuje najmä žltá zlúčenina cinnamaldehyd. Za žlté sfarbenie extraktov zázvoru sú podobne ako u kurkumy zodpovedné pravdepodobne zlúčeniny kurkumín, demetoxykurkumín a 6-dehydrogingerdión. U oleja extrahovaného z ľanových semiačok sa objavili peaky charakteristické pre chlorofyly a taktiež antokyaníny.

### 5.1.6 Stanovenie antioxidačnej aktivity

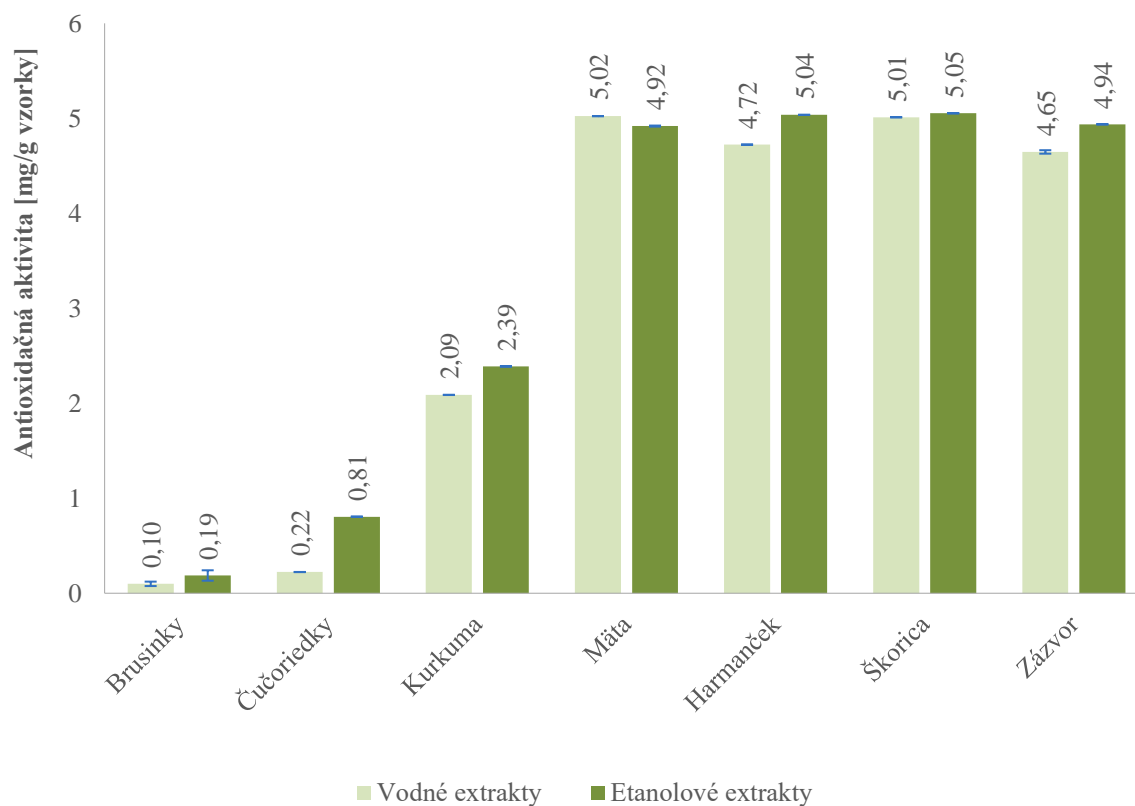
Pri metódach stanovenia antioxidačnej aktivity sa využívajú syntetické radikály voľne generované alebo postupne pridávané do reakčnej zmesi. V tejto práci bola použitá látka ABTS ako peroxidázový substrát tvoriaci v prítomnosti peroxidu vodíka reakciou s peroxylovými radikálmi alebo inými oxidantami metastabilný radikál-katión  $ABTS^{\bullet+}$  modrozeleného sfarbenia. Je spektrofotometricky stanoviteľný v rozmedzí vlnových dĺžok 600–750 nm. Antioxidačná aktivita stanovovaných extraktov slúžiacich v tejto reakcii ako donor vodíku je prezentovaná ako schopnosť znížiť intenzitu sfarbenia roztoku obsahujúceho  $ABTS^{\bullet+}$ .<sup>349</sup> Celková antioxidačná aktivita vzorky sa pri použitej TEAC metóde interpretuje ako ekvivalentné množstvo TROLOX-u, čo je vo vode rozpustná antioxidačne pôsobiaca látka štruktúrou podobná vitamínu E.

Výsledné hodnoty rozdielov absorbancií extraktov rastlín boli prepočítané na hmotnosť ekvivalentného množstva TROLOX-u v 1 grame danej rastliny (resp. v 1 grame oleja) podľa postupu v kapitole 4.2.6. V tabuľke 16 sú zhrnuté vypočítané hodnoty a na obrázku 16 graficky vyjadrené.

Tab. 16: Antioxidačná aktivita stanovená pre vybrané vzorky

Vzorka	Vodné extrakty [mg/g vzorky]	Etanolové extrakty [mg/g vzorky]
<b>Brusnice</b>	0,10 ± 0,02	0,19 ± 0,05
<b>Čučoriedky</b>	0,22 ± 0,00	0,81 ± 0,00
<b>Kurkuma</b>	2,09 ± 0,00	2,39 ± 0,00
<b>Mäta</b>	5,02 ± 0,00	4,92 ± 0,01
<b>Harmanček</b>	4,72 ± 0,00	5,04 ± 0,00
<b>Škorica</b>	5,01 ± 0,00	5,05 ± 0,00
<b>Zázvor</b>	4,65 ± 0,02	4,94 ± 0,00

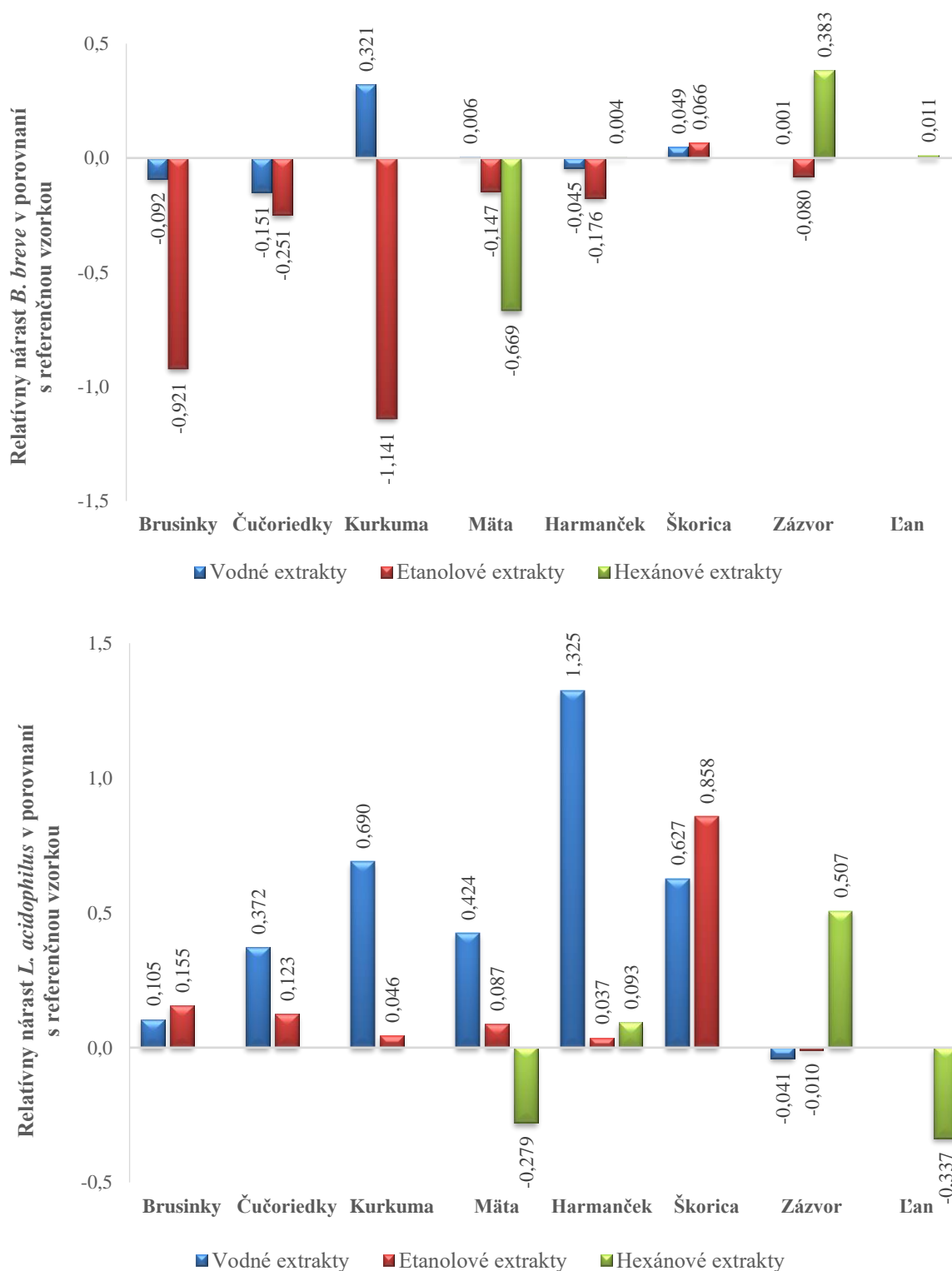
V grafe na obrázku 16 je vidieť, že až na vzorku čučoriedok nie je signifikantný rozdiel v antioxidačnej aktivite medzi vzorkami extrahovanými vodou a 20% etanolom. Relatívne rozloženie antioxidačnej aktivity medzi vzorkami je podobné obsahom fenolických látok a flavonoidov, preto sa dá predpokladať, že vo väčšine prípadov vykazovali antioxidačné vlastnosti najmä fenolické zlúčeniny. Výnimkou je zázvor, ktorý obsahuje nízke množstvo fenolov, ale i napriek tomu vykazuje pomerne vysokú antioxidačnú aktivitu. To nasvedčuje tomu, že obsahuje okrem antioxidantov s fenolickou štruktúrou i iný typ fytoantioxidantov. S najväčšou pravdepodobnosťou sa jedná o esenciálne oleje, resp. terpenové zlúčeniny. Vysoká antioxidačná aktivita môže súvisieť aj s typom použitej vzorky, keďže existujú štúdie potvrdzujúce vyššiu antioxidačnú aktivitu sušeného zázvoru (zvoleného i pre potreby tejto práce) ako čerstvého.<sup>350, 351</sup>



Obr. 16: Antioxidačná aktivita vybraných extraktov stanovená ako ekvivalentné množstvo TROLOX-u v grame danej vzorky

## 5.2 Interakcia bylenných extraktov s probiotikami

Pôsobenie prírodných extraktov v rôznych typoch rozpúšťadiel na probiotické bunky (*Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus acidophilus*) bolo stanovené podľa postupu v kapitole 4.4. Výsledné hodnoty sú pre jednotlivé kultúry spracované v tabuľke 17. Pre lepšiu názornosť sú spracované výsledky i vo forme relatívneho nárastu kultúr voči referenčnej vzorke (obrázok 17).



Obr. 17: Relatívny nárast probiotických kultúr v prítomnosti prírodných extraktov po 24 hodinách v porovnaní s referenčnou vzorkou bez extraktov (hexánové extrakty predstavujú oleje získané extrakciou hexánom)

Tab. 17: Ovplyvnenie životaschopnosti probiotik pridaním rastlinných extraktov (\*percentuálne vyjadrený nárast vzhľadom na referenčnú vzorku, tj. probiotiká s rozpúšťadlom)

<i>B. breve</i>	Vodné extrakty		Etanolové extrakty		Oleje	
	Počet buniek po 24 hodinách	Nárast kultúr*	Počet buniek po 24 hodinách	Nárast kultúr*	Počet buniek po 24 hodinách	Nárast kultúr*
<b>Bez extraktu</b>	$3,65 \cdot 10^9$ $\pm 4,51 \cdot 10^7$	0,0 %	$3,51 \cdot 10^9$ $\pm 2,55 \cdot 10^7$	0,0 %	$-7,59 \cdot 10^7$ $\pm 2,59 \cdot 10^6$	0,0 %
<b>Brusnice</b>	$3,42 \cdot 10^9$ $\pm 9,08 \cdot 10^7$	-6,3 %	$1,96 \cdot 10^9$ $\pm 1,06 \cdot 10^9$	-44,1 %	-	-
<b>Čučoriedky</b>	$3,27 \cdot 10^9$ $\pm 2,95 \cdot 10^8$	-10,3 %	$2,88 \cdot 10^9$ $\pm 1,85 \cdot 10^8$	-17,9 %	-	-
<b>Kurkuma</b>	$4,45 \cdot 10^9$ $\pm 2,36 \cdot 10^8$	22,0 %	$1,35 \cdot 10^9$ $\pm 8,32 \cdot 10^8$	-61,6 %	-	-
<b>Mäta</b>	$3,67 \cdot 10^9$ $\pm 3,68 \cdot 10^8$	0,4 %	$2,25 \cdot 10^9$ $\pm 1,14 \cdot 10^9$	-35,7 %	$-1,75 \cdot 10^9$ $\pm 2,87 \cdot 10^7$	-2 203 %
<b>Harmanček</b>	$3,54 \cdot 10^9$ $\pm 1,16 \cdot 10^8$	-3,1 %	$3,07 \cdot 10^9$ $\pm 7,37 \cdot 10^7$	-12,6 %	$-6,68 \cdot 10^7$ $\pm 2,95 \cdot 10^7$	12 %
<b>Škorica</b>	$3,77 \cdot 10^9$ $\pm 0,66 \cdot 10^8$	3,3 %	$3,67 \cdot 10^9$ $\pm 3,60 \cdot 10^8$	4,7 %	-	-
<b>Zázvor</b>	$3,65 \cdot 10^9$ $\pm 2,95 \cdot 10^8$	0,0 %	$3,31 \cdot 10^9$ $\pm 3,11 \cdot 10^8$	-5,7 %	$8,82 \cdot 10^8$ $\pm 1,09 \cdot 10^8$	1 262 %
<b>Ean</b>	-	-	-	-	$-4,80 \cdot 10^7$ $\pm 8,04 \cdot 10^5$	37 %

<i>L. acidophilus</i>	Vodné extrakty		Etanolové extrakty		Oleje	
	Počet buniek po 24 hodinách	Nárast kultúr*	Počet buniek po 24 hodinách	Nárast kultúr*	Počet buniek po 24 hodinách	Nárast kultúr*
<b>Bez extraktu</b>	$1,97 \cdot 10^8$ $\pm 7,85 \cdot 10^7$	0,0 %	$1,13 \cdot 10^8$ $\pm 1,42 \cdot 10^7$	0,0 %	$-4,84 \cdot 10^8$ $\pm 3,43 \cdot 10^8$	0,0 %
<b>Brusnice</b>	$4,60 \cdot 10^8$ $\pm 1,85 \cdot 10^8$	133,2 %	$5,02 \cdot 10^8$ $\pm 2,20 \cdot 10^8$	342,9 %	-	-
<b>Čučoriedky</b>	$1,13 \cdot 10^9$ $\pm 4,14 \cdot 10^8$	471,9 %	$4,22 \cdot 10^8$ $\pm 1,67 \cdot 10^8$	272,3 %	-	-
<b>Kurkuma</b>	$1,92 \cdot 10^9$ $\pm 1,04 \cdot 10^9$	875,0 %	$2,27 \cdot 10^8$ $\pm 4,55 \cdot 10^7$	100,4 %	-	-
<b>Mäta</b>	$1,26 \cdot 10^9$ $\pm 9,82 \cdot 10^8$	537,9 %	$9,75 \cdot 10^8$ $\pm 7,33 \cdot 10^8$	760,9 %	$-1,18 \cdot 10^9$ $\pm 1,47 \cdot 10^7$	-144 %
<b>Harmanček</b>	$3,51 \cdot 10^9$ $\pm 8,99 \cdot 10^7$	1 680,8 %	$2,05 \cdot 10^8$ $\pm 1,77 \cdot 10^7$	80,9 %	$-2,51 \cdot 10^8$ $\pm 4,17 \cdot 10^9$	48 %
<b>Škorica</b>	$1,76 \cdot 10^9$ $\pm 1,79 \cdot 10^8$	795,1 %	$1,80 \cdot 10^9$ $\pm 5,96 \cdot 10^8$	1 490,1 %	-	-
<b>Zázvor</b>	$9,49 \cdot 10^7$ $\pm 1,22 \cdot 10^7$	-51,8 %	$8,91 \cdot 10^7$ $\pm 2,25 \cdot 10^7$	-21,3 %	$7,82 \cdot 10^8$ $\pm 2,66 \cdot 10^7$	261 %
<b>Ean</b>	-	-	-	-	$-1,33 \cdot 10^9$ $\pm 2,04 \cdot 10^8$	-174 %

V prípade *B. breve* výrazne inhibičný efekt vykazovali extrakty brusnic a čučoriedok, etanolový extrakt kurkumy a harmančeku, a oleje mäty a ľanových semienok. Medzi extrakty, ktoré naopak pozitívne ovplyvnili nárast kultúry patrili vodný extrakt kurkumy, etanolový extrakt škorice a olej zo zázvoru. V tomto prípade je však inhibícia probiotík nežiadúca, takže vzorky, ktoré pôsobili na probiotické baktérie baktericídne, boli vylúčené z ďalších aplikácií a koenkapsulácií s probiotikami.

Probiotický kmeň *L. acidophilus* bol inhibovaný rastlinnými extraktmi celkovo menej ako *B. breve*. Značný inhibičný efekt vykazovali len oleje extrahované z mäty a ľanového semienka, prípadne v menšej miere vodný a etanolový extrakt zázvoru. Ostatné vzorky nepotlačali rast kultúry. Najväčší nárast bol zistený u vodného extraktu harmančeka, etanolového extraktu škorice a oleja zázvoru.

### 5.3 Vplyv rastlinných extraktov na viabilitu probiotík v priebehu modelového trávenia

Cieľom tohto experimentu bolo nasimulovať podmienky počas trávenia v ľudskom tele a pozorovať, či niektoré extrakty poskytujú počas tohto procesu ochranu probiotickým baktériám. Princíp merania bol analogický ako v kapitole 5.2.

Za využitia 96-jamkovej mikrotitračnej doštičky a rozdielu zákalu v čase 0 a 24 hodín bol sledovaný a porovnávaný počet probiotických baktérií v prítomnosti jednotlivých extraktov pred samotným začiatkom trávenia, po pôsobení žalúdočnej šťavy a po účinku črevných štiav. Počet buniek bol opäť prepočítaný na základe kalibračnej závislosti absorbancie pri 630 nm na počte bakteriálnych buniek stanovených nepriamou kultivačnou metódou, uvedenej v kapitole 4.4.

Výsledné vypočítané hodnoty sú uvedené v tabuľkách 18 a 19. Farebne sú odlišené vzorky, pri ktorých pôsobení bol pozorovaný signifikantný nárast probiotických kultúr najmä po skončení modelového trávenia.

Tab. 18: Ovplynenie nárastu *B. breve* kopôsobením rastlinných extraktov v priebehu modelového trávenia (\*percentuálne vyjadrený nárast vzhľadom na referenčnú vzorku, tj. probiotiká s rozpúšťadlom)

Vodné extrakty	Pred trávením		Po pôsobení žalúdočnej šť.		Po pôsobení črevných štiav	
	Počet buniek po 24 hodinách	Nárast kultúr*	Počet buniek po 24 hodinách	Nárast kultúr*	Počet buniek po 24 hodinách	Nárast kultúr*
<b>Voda</b>	$6,22 \cdot 10^8$ $\pm 2,00 \cdot 10^8$	0 %	$1,64 \cdot 10^8$ $\pm 3,51 \cdot 10^7$	0 %	$1,52 \cdot 10^8$ $\pm 4,94 \cdot 10^7$	0 %
<b>Brusnice</b>	$6,01 \cdot 10^8$ $\pm 3,72 \cdot 10^7$	-3 %	$1,55 \cdot 10^8$ $\pm 2,22 \cdot 10^7$	-5 %	$2,49 \cdot 10^7$ $\pm 6,28 \cdot 10^6$	-84 %
<b>Čučoriedky</b>	$2,18 \cdot 10^9$ $\pm 2,58 \cdot 10^8$	251 %	$1,86 \cdot 10^8$ $\pm 9,70 \cdot 10^6$	13 %	$5,62 \cdot 10^7$ $\pm 8,38 \cdot 10^6$	-63 %
<b>Kurkuma</b>	$3,80 \cdot 10^8$ $\pm 3,11 \cdot 10^7$	-39 %	$2,45 \cdot 10^8$ $\pm 2,52 \cdot 10^7$	50 %	$-1,84 \cdot 10^8$ $\pm 3,03 \cdot 10^7$	-221 %
<b>Mäta</b>	$2,00 \cdot 10^8$ $\pm 1,12 \cdot 10^7$	-68 %	$1,24 \cdot 10^8$ $\pm 3,65 \cdot 10^7$	-25 %	$1,76 \cdot 10^9$ $\pm 5,02 \cdot 10^8$	1 059 %
<b>Harmanček</b>	$1,70 \cdot 10^9$ $\pm 7,50 \cdot 10^7$	173 %	$2,22 \cdot 10^8$ $\pm 4,14 \cdot 10^7$	35 %	$-1,56 \cdot 10^8$ $\pm 7,96 \cdot 10^7$	-202 %
<b>Škorica</b>	$-1,86 \cdot 10^9$ $\pm 7,53 \cdot 10^7$	-400 %	$4,42 \cdot 10^8$ $\pm 1,42 \cdot 10^8$	170 %	$3,67 \cdot 10^8$ $\pm 1,25 \cdot 10^8$	141 %
<b>Zázvor</b>	$9,16 \cdot 10^7$ $\pm 4,57 \cdot 10^7$	-85 %	$4,49 \cdot 10^7$ $\pm 2,39 \cdot 10^7$	-73 %	$1,29 \cdot 10^8$ $\pm 3,52 \cdot 10^7$	-15 %

Tab. 18: Oplyvnenie nárastu *B. breve* kopôsobením rastlinných extraktov v priebehu modelového trávenia (\*percentuálne vyjadrený nárast vzhľadom na referenčnú vzorku, tj. probiotiká s rozpúšťadlom) – pokračovanie

Etanolové extrakty	Pred trávením		Po pôsobení žalúdočnej šť.		Po pôsobení črevných štiav	
	Počet buniek po 24 hodinách	Nárast kultúr*	Počet buniek po 24 hodinách	Nárast kultúr*	Počet buniek po 24 hodinách	Nárast kultúr*
<b>20% etanol</b>	$2,32 \cdot 10^9$ $\pm 9,36 \cdot 10^7$	0 %	$2,12 \cdot 10^8$ $\pm 7,14 \cdot 10^6$	0 %	$5,24 \cdot 10^7$ $\pm 6,62 \cdot 10^6$	0 %
<b>Brusnice</b>	$8,20 \cdot 10^8$ $\pm 2,69 \cdot 10^7$	-65 %	$2,22 \cdot 10^8$ $\pm 1,32 \cdot 10^7$	5 %	$-5,63 \cdot 10^7$ $\pm 1,64 \cdot 10^6$	-207 %
<b>Čučoriedky</b>	$4,81 \cdot 10^9$ $\pm 1,34 \cdot 10^8$	107 %	$2,82 \cdot 10^8$ $\pm 7,31 \cdot 10^6$	33 %	$-6,05 \cdot 10^7$ $\pm 3,97 \cdot 10^7$	-215 %
<b>Kurkuma</b>	$4,21 \cdot 10^8$ $\pm 2,06 \cdot 10^7$	-82 %	$2,61 \cdot 10^8$ $\pm 3,80 \cdot 10^6$	23 %	$-1,63 \cdot 10^8$ $\pm 2,56 \cdot 10^7$	-410 %
<b>Mäta</b>	$2,04 \cdot 10^8$ $\pm 1,61 \cdot 10^7$	-91 %	$2,57 \cdot 10^8$ $\pm 1,86 \cdot 10^7$	21 %	$5,75 \cdot 10^6$ $\pm 1,61 \cdot 10^6$	-89 %
<b>Harmanček</b>	$1,97 \cdot 10^9$ $\pm 9,26 \cdot 10^7$	-15 %	$3,02 \cdot 10^8$ $\pm 1,32 \cdot 10^7$	43 %	$9,28 \cdot 10^7$ $\pm 2,75 \cdot 10^6$	77 %
<b>Škorica</b>	$-1,10 \cdot 10^9$ $\pm 2,91 \cdot 10^8$	-147 %	$3,07 \cdot 10^8$ $\pm 3,64 \cdot 10^7$	45 %	$4,21 \cdot 10^8$ $\pm 3,93 \cdot 10^7$	703 %
<b>Zázvor</b>	$2,19 \cdot 10^8$ $\pm 1,69 \cdot 10^7$	-91 %	$1,59 \cdot 10^8$ $\pm 2,22 \cdot 10^7$	-25 %	$1,12 \cdot 10^7$ $\pm 3,17 \cdot 10^6$	-79 %

Olejové extrakty	Pred trávením		Po pôsobení žalúdočnej šť.		Po pôsobení črevných štiav	
	Počet buniek po 24 hodinách	Nárast kultúr*	Počet buniek po 24 hodinách	Nárast kultúr*	Počet buniek po 24 hodinách	Nárast kultúr*
<b>DMSO</b>	$2,32 \cdot 10^9$ $\pm 3,05 \cdot 10^7$	0 %	$4,66 \cdot 10^9$ $\pm 1,77 \cdot 10^8$	0 %	$4,05 \cdot 10^8$ $\pm 2,60 \cdot 10^8$	0 %
<b>Kurkuma</b>	$-2,35 \cdot 10^9$ $\pm 2,66 \cdot 10^8$	-201 %	$3,67 \cdot 10^8$ $\pm 1,04 \cdot 10^7$	-92 %	$-5,76 \cdot 10^7$ $\pm 1,69 \cdot 10^6$	-114 %
<b>Mäta</b>	$9,72 \cdot 10^8$ $\pm 7,30 \cdot 10^7$	-58 %	$3,91 \cdot 10^9$ $\pm 5,78 \cdot 10^8$	-16 %	$1,16 \cdot 10^7$ $\pm 1,16 \cdot 10^6$	-97 %
<b>Harmanček</b>	$1,16 \cdot 10^9$ $\pm 7,79 \cdot 10^7$	-50 %	$2,52 \cdot 10^9$ $\pm 1,13 \cdot 10^8$	-46 %	$-9,36 \cdot 10^7$ $\pm 3,79 \cdot 10^7$	-124 %
<b>Škorica</b>	$-1,86 \cdot 10^8$ $\pm 7,67 \cdot 10^7$	-108 %	$-9,63 \cdot 10^7$ $\pm 1,41 \cdot 10^7$	-102 %	$-1,15 \cdot 10^8$ $\pm 1,32 \cdot 10^7$	-128 %
<b>Zázvor</b>	$-4,51 \cdot 10^9$ $\pm 2,33 \cdot 10^8$	-295 %	$-1,78 \cdot 10^9$ $\pm 4,06 \cdot 10^8$	-138 %	$-2,30 \cdot 10^7$ $\pm 2,21 \cdot 10^6$	-106 %
<b>Ean</b>	$2,02 \cdot 10^9$ $\pm 3,13 \cdot 10^7$	-13 %	$2,40 \cdot 10^9$ $\pm 1,43 \cdot 10^8$	-48 %	$3,16 \cdot 10^7$ $\pm 5,72 \cdot 10^6$	-92 %

Najväčší nárast kultúr po ukončení procesu modelového trávenia bol v prípade *B. breve* pri prídavku vodných extraktov mäty a škorice, a tiež etanolových extraktov harmančku a škorice. Oleje naopak podporili inhibíciu baktérií v priebehu prechodu tráviacimi šťavami. Výrazný pokles kultúr bol sledovaný už i u vzoriek, ktoré neboli vystavené tráviacim šťavam.

Vodné a etanolové extrakty vykazovali vo väčšine prípadov zaujímavú ochrannú funkciu pre probiotiká pred žalúdočnou šťavou. Avšak po pôsobení črevných štiav bolo pozorované značné zníženie životaschopnosti buniek, čo robí tieto extrakty nevhodnými pre potreby tejto práce.

Tab. 19: Oplyvnenie nárastu *L. acidophilus* kopôsobením rastlinných extraktov v priebehu modelového trávenia (\*percentuálne vyjadrený nárast vzhľadom na referenčnú vzorku, tj. probiotiká s rozpúšťadlom)

Vodné extrakty	Pred trávením		Po pôsobení žalúdočnej šť.		Po pôsobení črevných štiav	
	Počet buniek po 24 hodinách	Nárast kultúr*	Počet buniek po 24 hodinách	Nárast kultúr*	Počet buniek po 24 hodinách	Nárast kultúr*
<b>Voda</b>	$5,88 \cdot 10^8$ $\pm 7,63 \cdot 10^7$	0 %	$1,92 \cdot 10^8$ $\pm 1,83 \cdot 10^7$	0 %	$4,26 \cdot 10^8$ $\pm 6,30 \cdot 10^7$	0 %
<b>Brusnice</b>	$-9,30 \cdot 10^7$ $\pm 1,47 \cdot 10^6$	-116 %	$2,26 \cdot 10^8$ $\pm 1,13 \cdot 10^7$	18 %	$-1,79 \cdot 10^8$ $\pm 1,39 \cdot 10^6$	-142 %
<b>Čučoriedky</b>	$-2,21 \cdot 10^8$ $\pm 3,38 \cdot 10^7$	-138 %	$2,65 \cdot 10^8$ $\pm 7,38 \cdot 10^6$	38 %	$-1,52 \cdot 10^8$ $\pm 2,23 \cdot 10^7$	-136 %
<b>Kurkuma</b>	$2,65 \cdot 10^9$ $\pm 2,38 \cdot 10^8$	352 %	$2,04 \cdot 10^8$ $\pm 1,17 \cdot 10^7$	6 %	$-8,26 \cdot 10^7$ $\pm 6,50 \cdot 10^7$	-119 %
<b>Mäta</b>	$3,55 \cdot 10^9$ $\pm 1,17 \cdot 10^7$	504 %	$2,30 \cdot 10^8$ $\pm 7,13 \cdot 10^6$	20 %	$4,16 \cdot 10^8$ $\pm 5,83 \cdot 10^7$	-2 %
<b>Harmanček</b>	$6,72 \cdot 10^8$ $\pm 1,62 \cdot 10^8$	14 %	$2,67 \cdot 10^8$ $\pm 1,49 \cdot 10^7$	39 %	$-8,84 \cdot 10^7$ $\pm 1,33 \cdot 10^6$	-121 %
<b>Škorica</b>	$2,45 \cdot 10^8$ $\pm 2,12 \cdot 10^7$	-58 %	$4,76 \cdot 10^8$ $\pm 6,11 \cdot 10^6$	149 %	$1,06 \cdot 10^9$ $\pm 1,06 \cdot 10^8$	149 %
<b>Zázvor</b>	$3,44 \cdot 10^9$ $\pm 3,32 \cdot 10^8$	485 %	$1,45 \cdot 10^8$ $\pm 9,78 \cdot 10^6$	-24 %	$-1,17 \cdot 10^7$ $\pm 9,87 \cdot 10^5$	-103 %

Etanolové extrakty	Pred trávením		Po pôsobení žalúdočnej šť.		Po pôsobení črevných štiav	
	Počet buniek po 24 hodinách	Nárast kultúr*	Počet buniek po 24 hodinách	Nárast kultúr*	Počet buniek po 24 hodinách	Nárast kultúr*
<b>20% etanol</b>	$7,87 \cdot 10^7$ $\pm 1,81 \cdot 10^7$	0 %	$1,04 \cdot 10^8$ $\pm 4,71 \cdot 10^6$	0 %	$-2,65 \cdot 10^8$ $\pm 1,17 \cdot 10^8$	0 %
<b>Brusnice</b>	$-5,13 \cdot 10^7$ $\pm 2,15 \cdot 10^7$	-165 %	$1,60 \cdot 10^8$ $\pm 5,86 \cdot 10^6$	54 %	$-1,88 \cdot 10^8$ $\pm 1,44 \cdot 10^8$	29 %
<b>Čučoriedky</b>	$8,12 \cdot 10^7$ $\pm 9,60 \cdot 10^6$	3 %	$1,77 \cdot 10^8$ $\pm 2,39 \cdot 10^7$	70 %	$-1,71 \cdot 10^8$ $\pm 1,33 \cdot 10^8$	35 %
<b>Kurkuma</b>	$3,19 \cdot 10^8$ $\pm 5,68 \cdot 10^6$	305 %	$1,92 \cdot 10^8$ $\pm 6,09 \cdot 10^6$	84 %	$-8,30 \cdot 10^7$ $\pm 1,05 \cdot 10^6$	69 %
<b>Mäta</b>	$2,86 \cdot 10^8$ $\pm 1,18 \cdot 10^8$	264 %	$1,70 \cdot 10^8$ $\pm 3,23 \cdot 10^7$	63 %	$-2,19 \cdot 10^8$ $\pm 8,38 \cdot 10^7$	17 %
<b>Harmanček</b>	$4,19 \cdot 10^9$ $\pm 1,09 \cdot 10^8$	5232 %	$2,03 \cdot 10^8$ $\pm 4,80 \cdot 10^7$	95 %	$2,30 \cdot 10^9$ $\pm 9,07 \cdot 10^8$	967 %
<b>Škorica</b>	$8,15 \cdot 10^8$ $\pm 2,77 \cdot 10^8$	936 %	$3,44 \cdot 10^8$ $\pm 5,54 \cdot 10^7$	231 %	$2,81 \cdot 10^9$ $\pm 4,82 \cdot 10^8$	1159 %
<b>Zázvor</b>	$1,79 \cdot 10^9$ $\pm 4,48 \cdot 10^8$	2179 %	$1,62 \cdot 10^8$ $\pm 2,82 \cdot 10^7$	56 %	$2,04 \cdot 10^9$ $\pm 1,08 \cdot 10^9$	868 %

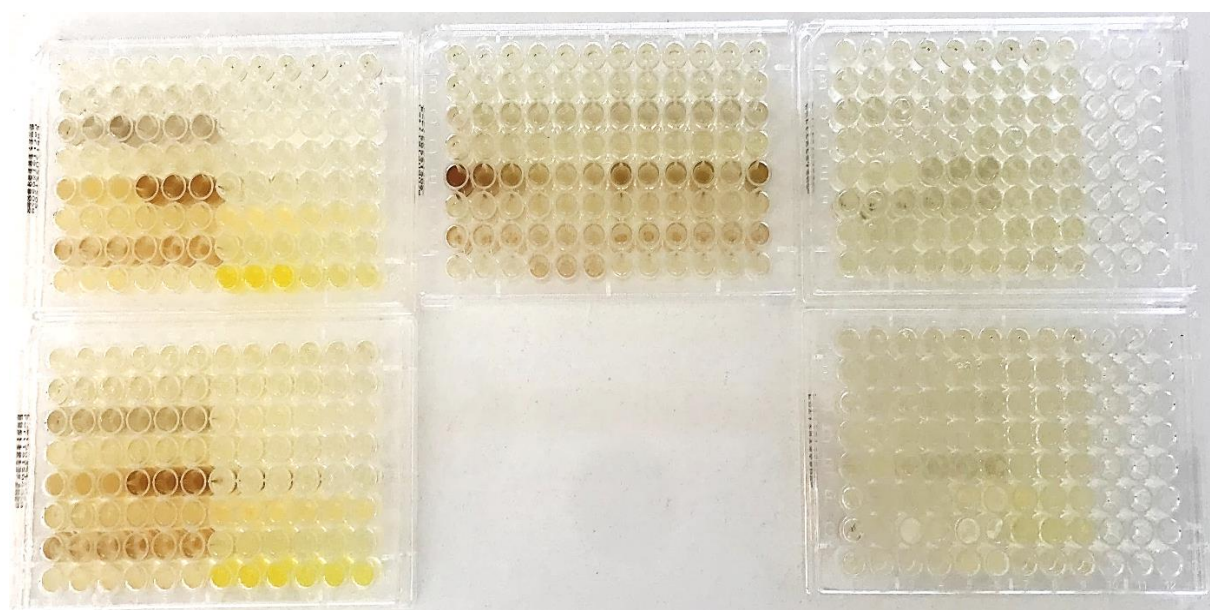


Tab. 19: Oplyvnenie nárastu *L. acidophilus* kopôsobením rastlinných extraktov v priebehu modelového trávenia (\*percentuálne vyjadrený nárast vzhľadom na referenčnú vzorku, tj. probiotiká s rozpúšťadlom) - pokračovanie

Olejové extrakty	Pred trávením		Po pôsobení žalúdočnej šť.		Po pôsobení črevných štiav	
	Počet buniek po 24 hodinách	Nárast kultúr*	Počet buniek po 24 hodinách	Nárast kultúr*	Počet buniek po 24 hodinách	Nárast kultúr*
DMSO	$2,29 \cdot 10^8$ $\pm 1,78 \cdot 10^7$	0 %	$1,32 \cdot 10^8$ $\pm 9,43 \cdot 10^7$	0 %	$1,82 \cdot 10^8$ $\pm 2,68 \cdot 10^7$	0 %
Kurkuma	$-9,96 \cdot 10^8$ $\pm 1,76 \cdot 10^8$	-524 %	$-4,48 \cdot 10^8$ $\pm 6,17 \cdot 10^7$	-439 %	$-3,07 \cdot 10^8$ $\pm 5,83 \cdot 10^6$	-269 %
Mäta	$3,13 \cdot 10^8$ $\pm 7,60 \cdot 10^6$	37 %	$2,32 \cdot 10^8$ $\pm 1,91 \cdot 10^7$	76 %	$-7,72 \cdot 10^7$ $\pm 7,98 \cdot 10^6$	-140 %
Harmanček	$2,40 \cdot 10^8$ $\pm 2,33 \cdot 10^7$	5 %	$2,63 \cdot 10^8$ $\pm 1,29 \cdot 10^7$	99 %	$1,87 \cdot 10^8$ $\pm 7,57 \cdot 10^6$	3 %
Škorica	$2,27 \cdot 10^8$ $\pm 2,76 \cdot 10^7$	-1 %	$1,39 \cdot 10^8$ $\pm 4,10 \cdot 10^7$	5 %	$-1,12 \cdot 10^8$ $\pm 5,6 \cdot 10^7$	-162 %
Zázvor	$-2,56 \cdot 10^8$ $\pm 2,30 \cdot 10^7$	-212 %	$-1,17 \cdot 10^8$ $\pm 7,41 \cdot 10^7$	-189 %	$6,91 \cdot 10^7$ $\pm 2,61 \cdot 10^7$	-62 %
Lan	$-4,80 \cdot 10^8$ $\pm 8,56 \cdot 10^7$	-310 %	$-3,24 \cdot 10^8$ $\pm 8,13 \cdot 10^7$	-346 %	$-2,64 \cdot 10^8$ $\pm 1,82 \cdot 10^8$	-245 %

Viabilita *L. acidophilus* bola v priebehu modelového trávenia oveľa vyššia ako v prípade *B. breve*. Tieto výsledky korelujú s testovaním vplyvu samotných extraktov na probiotické kultúry v kapitole 5.2. Z vodných extraktov sa preukázala škorica ako extrakt chrániaci baktérie pred zničením agresívnym prostredím tráviacich štiav. U ostatných vzoriek bol pozorovaný výrazný pokles kultúr.

U etanolových extraktov bol vo všetkých vzorkách pozorovaný nárast kultúr vyšší ako u referenčnej vzorky. Najvyšší nárast po pôsobení tráviacich štiav sa preukázal u harmančeka, škorice a zázvoru. Pravdepodobne sa do týchto vzoriek vyextrahovali prebiotické látky, či iné molekuly podporujúce životaschopnosť a výživu baktérií a poskytujúce ochranu pred tráviacimi enzýmami. Ďalšou možnosťou je prípadná čiastočná neutralizácia kyslého prostredia. V prípade olejov bol malý nárast detegovaný len u harmančekového oleja, ostatné látky značne inhibovali rast *L. acidophilus*.



Obr. 18: Ukážka vzoriek extraktov s probiotikami nanesených na mikrotitračnú doštičku v rôznych štádiách modelového trávenia

Keďže cieľom tejto práce je pripraviť probiotické častice obohatené o protizápalové prírodné látky, po stanovení množstva bioaktívnych fenolických zlúčenín a antioxidačnej aktivity je ďalej vhodné sa zaoberať s extraktmi, v ktorých boli detegované vysoké obsahy týchto požadovaných vlastností. Zhrňujúce výsledky z priebežných analýz spolu s označením extraktov s najlepšimi výsledkami sú prehľadne zhrnuté v tabuľke 20. Na základe stanovení vplyvu jednotlivých extraktov na viabilitu použitých probiotických kultúr a charakterizácie ich významných bioaktívnych látok boli ako najvhodnejšie pre ďalšie spracovanie a analýzy vybrané: vodné a etanolové extrakty mäty, harmančeka a škorice, a olej extrahovaný pomocou hexánu zo zázvoru.

Tab. 20: Zhrnutie vlastností pripravených extraktov vzhľadom na účely tejto práce, konkrétne vplyvu na viabilitu probiotik a obsahu biologicky aktívnych látok

	Extrakt	<i>B. breve</i>		<i>L. acidophilus</i>		Obsah fenolických látok	Obsah karotenoidov	Antioxidačná aktivita
		Vplyv extraktu	Po pôsobení tráv. šťiav	Vplyv extraktu	Po pôsobení tráv. šťiav			
1. Brusnice	vodný	x	x	✓✓	x	x	x	x
	etanolový	x	x	✓✓	✓	x	x	x
2. Čučoriedky	vodný	x	x	✓✓	x	x	✓	x
	etanolový	x	x	✓✓	✓	x	✓	x
3. Kurkuma	vodný	✓	x	✓✓	x	x	✓✓	✓
	etanolový	x	x	✓✓	✓	x	✓✓	✓
	olejový	-	x	-	x	✓✓✓	✓✓✓	-
4. Mäta	vodný	x	✓✓✓	✓✓	✓	✓✓✓	✓	✓✓✓
	etanolový	x	x	✓✓	✓	✓✓✓	✓✓	✓✓
	olejový	x	x	x	x	✓	✓	-
5. Harmanček	vodný	x	x	✓✓✓	x	✓✓	x	✓✓
	etanolový	x	✓	✓	✓✓	✓✓✓	✓	✓✓✓
	olejový	x	x	x	✓	✓	✓✓	-
6. Škorica	vodný	✓	✓✓	✓✓	✓	✓✓✓	✓	✓✓✓
	etanolový	✓	✓✓	✓✓✓	✓✓✓	✓✓✓	✓	✓✓✓
	olejový	-	x	-	x	✓	✓✓	-
7. Zázvor	vodný	x	x	x	x	✓	x	✓✓
	etanolový	x	x	x	✓✓	✓	x	✓✓
	olejový	✓✓✓	x	✓✓	x	x	✓	-
8. Ľan	olejový	x	x	x	x	x	✓	-

Vyhodnotenie: ✓/✓✓/✓✓✓ vhodné pre ďalšie aplikácie; x nevhodné; - neanalyzované

#### 5.4 Testovanie cytotoxicity vybraných extraktov s využitím bunkovej línie CaCo-2

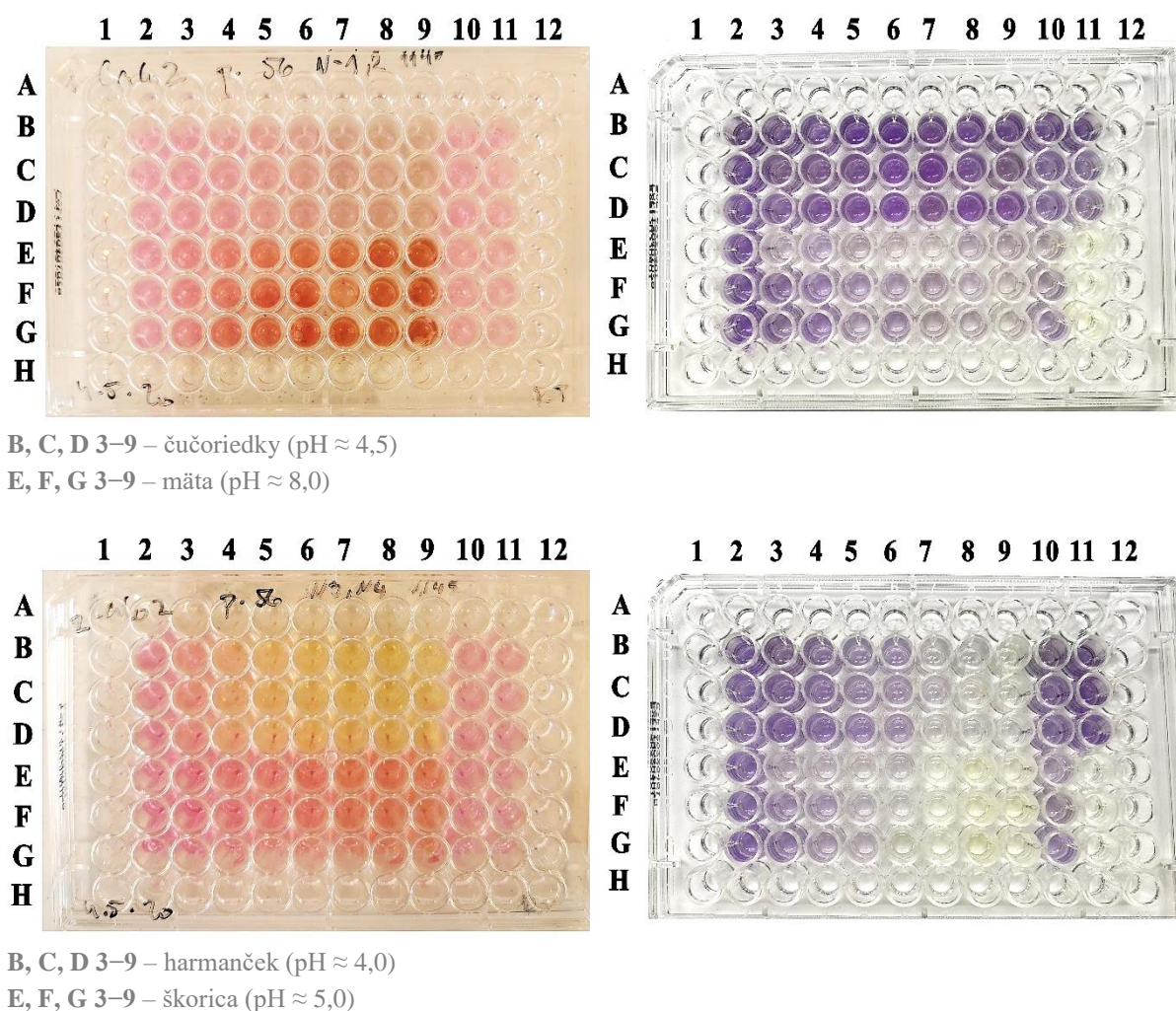
Bunkové línie sú jedným z hlavných nástrojov bunkovej biológie. Slúžia ako modelový systém pre štúdium metabolických dejov, starnutia, mutagenézy, karcinogenézy, vplyvu xenobiótik a toxických látok. V tomto experimente boli zvolené modelové ľudské črevné epiteliálne bunky, simulujúce prostredie čriev. U zvolených extraktov bola ešte pred samotnou koenkapsuláciou s probiotikami otestovaná ich cytotoxicita voči vybranej bunkovej línii CaCo-2. Ako konkrétna metóda testovania bol prevedený MTT test. Informácia o prípadnej cytotoxicite je veľmi dôležitá pri príprave častíc, aby bola zvolená bezpečná koncentrácia rastlinných extraktov.

### 5.4.1 MTT test

Viabilita, resp. životaschopnosť buniek a proliferácia sú posudzované najčastejšie kolorimetrickými testami, pričom medzi najpoužívanejšie patrí MTT test. Je založený na schopnosti redukcie solubilného roztoku MTT na fialový formazan nerozpustný vo vode živými bunkami, ktoré majú na rozdiel od poškodených alebo mŕtvych buniek funkčné mitochondriálne dehydrogenázy. Stupeň premeny MTT na formazan je priamo úmerný aktivite mitochondriálnych dehydrogenáz, čiže metabolickej aktivite buniek a ich životaschopnosti. Reakcia prebieha na mitochondriálnej membráne živých buniek a vzniknuté kryštály formazanu sa rozpustia vplyvom silného detergentu (napr. DMSO) za vzniku fialového roztoku. Stupeň zafarbenia sa následne vyhodnocuje spektrofotometricky.<sup>354</sup>

Je potrebné, aby sa bunky počas celej doby experimentu nachádzali v logaritmickej fáze bunkového rastu, v ktorej sú najmenej vystavené stresovým faktorom spojeným so samotnou kultiváciou.

MTT test bol prevádzaný na 96-jamkovej mikrotitračnej doštičke, na ktorú boli podľa schémy v kapitole 4.6.2 nanosené riedené extrakty čučoriedok, mäty, harmančeka a škorice. Názorná ukážka vzoriek po nanosení na doštičku s bunkami (56. pasáž) a konečný výsledok po pôsobení MTT je zobrazená na obrázku 19. Vlastnosťou použitého média je farebná indikácia zmeny pH, čo sa značne prejavilo po zmiešaní s danými extraktmi. Namerané pH u jednotlivých vzoriek (viď obrázok 19) odpovedá tejto farebnej rozdielnosti. Viabilita buniek bola spočítaná ako pomer absorbancie vzorky voči kontrole obsahujúcej len médium.



Obr. 19: Ukážka CaCo-2 buniek spolu s rôzne nariadenými extraktmi (vľavo) a po pridaní MTT (vpravo)

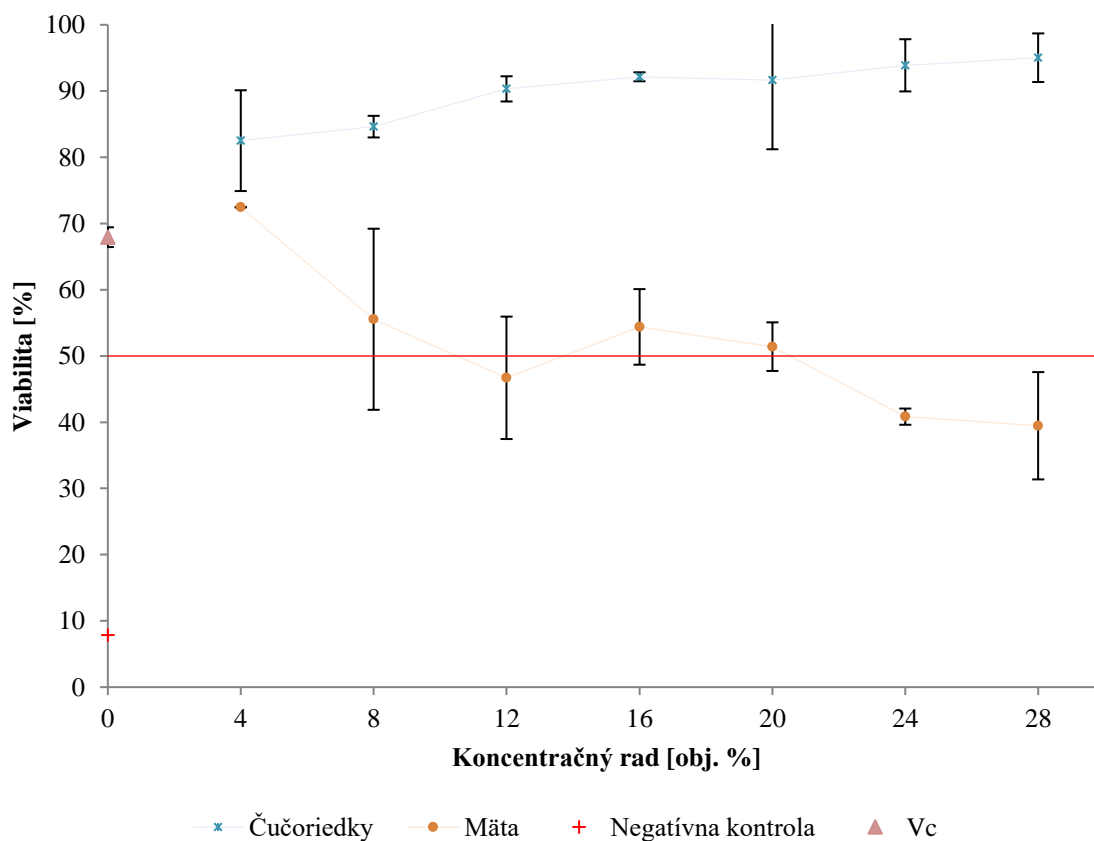
Z nameraných hodnôt výsledných absorbancií boli stanovené inhibičné koncentrácie daných látok a prepočítané na percentuálne množstvo udávajúce viabilitu buniek, resp. aktivitu bunkového metabolizmu (tabuľka 21). Tieto hodnoty udávajú, pri ktorej koncentrácii došlo k 50% usmrteniu buniek, čo je považované za hraničnú hodnotu cytotoxicity. Čím nižšia je výsledná hodnota, tým väčšiu cytotoxicitu daná vzorka vykazuje. Graficky znázornené výsledky sa nachádzajú na obrázkoch 20 a 21.

Jediná vzorka nevykazujúca žiadne cytotoxické vlastnosti bol extrakt čučoriedok. I vo svojej najvyššej testovanej koncentrácii (28 %) stále dosahovala viabilita buniek viac ako 90 %.

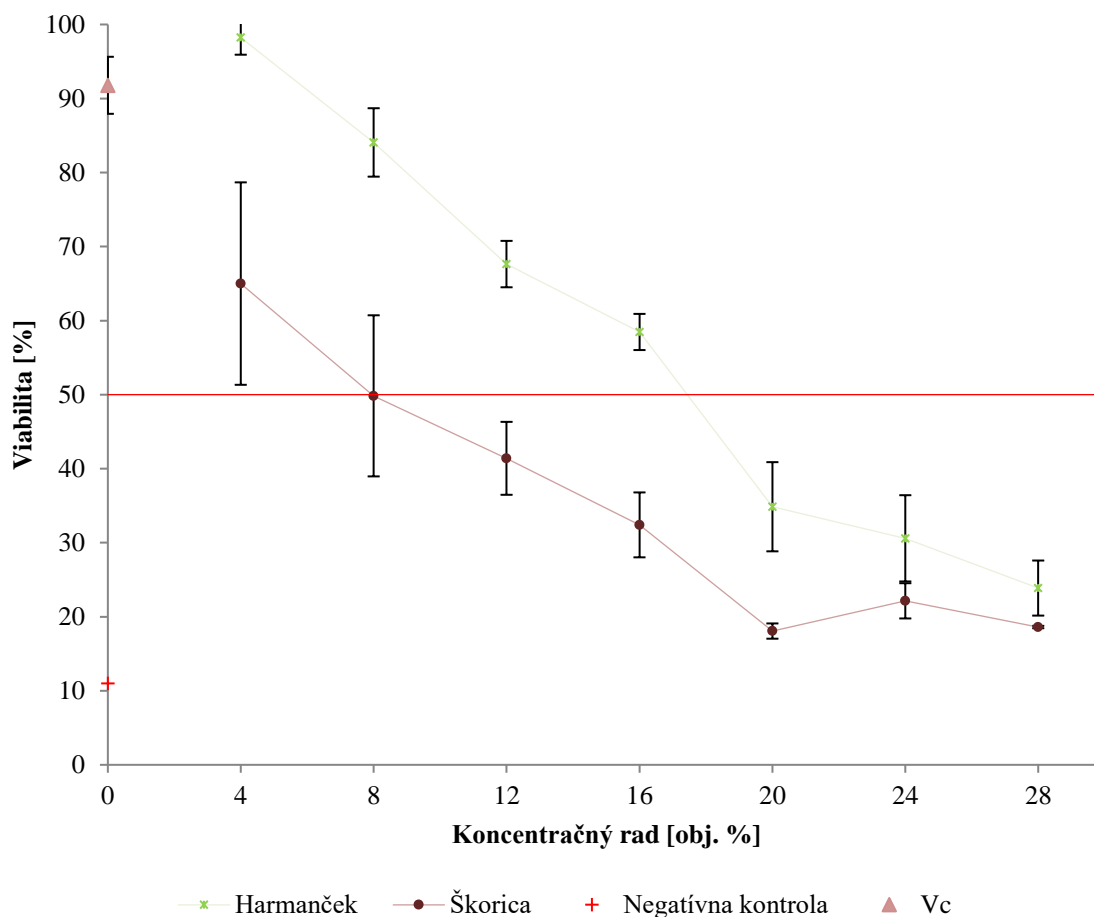
V prípade harmančeka i napriek svojmu nízkemu pH sa dá považovať za bezpečnú koncentrácia roztoku do 17 %. Pri vzorkách mäty a škorice je vhodné pre prípadné ďalšie aplikácie v potravinárskom priemysle používať koncentrácie len do približne 8 %.

Tab. 21: Vyhodnotenie MTT testu pre vzorky 1) čučoriedok, 2) mäty, 3) harmančeka a 4) škorice

1)	Viabilita [%]	2)	Viabilita [%]	3)	Viabilita [%]	4)	Viabilita [%]
4 %	82,51 ± 7,61	4 %	72,45 ± 0,00	4 %	98,23 ± 2,31	4 %	65,00 ± 13,67
8 %	84,63 ± 1,63	8 %	55,54 ± 13,67	8 %	84,07 ± 4,62	8 %	49,84 ± 10,88
12 %	90,33 ± 1,90	12 %	46,70 ± 9,24	12 %	67,64 ± 3,13	12 %	41,40 ± 4,93
16 %	92,15 ± 0,68	16 %	54,39 ± 5,71	16 %	58,47 ± 2,44	16 %	32,41 ± 4,38
20 %	91,67 ± 10,46	20 %	51,41 ± 3,67	20 %	34,86 ± 6,02	20 %	18,07 ± 1,03
24 %	93,88 ± 3,94	24 %	40,84 ± 1,22	24 %	30,59 ± 5,82	24 %	22,15 ± 2,38
28 %	95,04 ± 3,67	28 %	39,46 ± 8,10	28 %	23,88 ± 3,72	28 %	18,61 ± 0,16



Obr. 20: Výsledné hodnoty MTT testu pre extrakt čučoriedok a mäty (červená línia značí hranicu toxicity)



Obr. 21: Výsledné hodnoty MTT testu pre extrakt harmančeka a škorice (červená línia značí hranicu toxicity)









## 5.5 Enkapsulácia vybraných extraktov a probiotík

Procesom enkapsulácie je možné zvýšiť stabilitu i životnosť a požadované vlastnosti ako probiotík, tak prchavých fenolických zlúčenín vykazujúcich protizápalové vlastnosti. V tejto práci použitý postup bol vybraný z práce, ktorá sa zaoberala optimalizáciou enkapsulačných metód a obalových materiálov vhodných pre probiotické bunky.<sup>353</sup> Bol preto zvolený alginát ako polymérna matrica. Veľkosť častíc bola zvolená 1 000  $\mu\text{m}$ . Častice o tejto veľkosti sú najmä pri zaujímavom zafarbení samotnými extraktmi vzhľadovo pomerne atraktívne a môžu nájsť široké uplatnenie, či už by mali byť konzumované samotné alebo primiešané do rôznych potravinových matric podľa výberu konzumenta. Sensorická analýza však nebola v rámci tejto práce prevádzaná.

K enkapsulácii bola použitá 24-hodinová kultúra kmeňov *B. breve* a *L. acidophilus*, ktorá už obsahovala dostatočné množstvo buniek s vysokou viabilitou. Počet buniek bol ešte pred enkapsuláciou stanovený (viď kapitola 5.5.1), pričom bolo overené, že sa vo vzorkách nenachádza prípadná kontaminácia. Pri kombinácii s rastlinnými extraktmi bolo potrebné si na základe výsledkov z MTT testu v kapitole 5.4 dávať pozor pri príprave zmesí, aby koncentrácia extraktov nepresiahla hranicu cytotoxicity voči črevným bunkám.

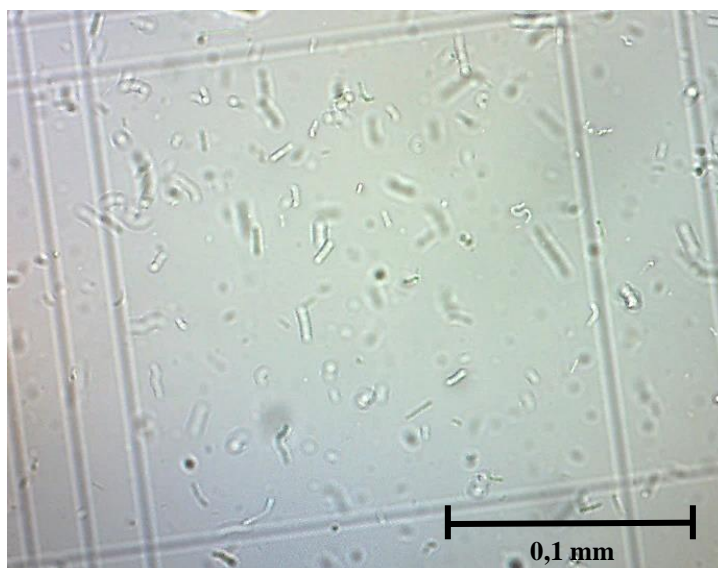
Ukážka všetkých pripravených častíc vrátane zloženia a výsledného množstva pripraveného z 19 ml enkapsulovanej zmesi sa nachádza v tabuľke 22. Pripravené častice obohatené rastlinným extraktom si zachovali príjemnú arómu typickú pre jednotlivé pôvodné extrakty.

Tab. 22: Pripravené častice, ich označenie používané ďalej v práci, popis jednotlivých zložiek a hmotnosť pripravených častíc z 19 ml pôvodnej alginátovej zmesi

 <b>B1)</b> <i>B. breve</i> + mäta 10,442 8 g	 <b>B2)</b> <i>B. breve</i> + harmanček 12,321 7 g	 <b>B3)</b> <i>B. breve</i> + škorica 11,356 8 g	 <b>B4)</b> <i>B. breve</i> 8,738 6 g
 <b>L1)</b> <i>L. acidophilus</i> + mäta 11,860 0 g	 <b>L2)</b> <i>L. acidophilus</i> + harmanček 12,563 5 g	 <b>L3)</b> <i>L. acidophilus</i> + škorica 11,058 1 g	 <b>L4)</b> <i>L. acidophilus</i> 9,567 2 g

### 5.5.1 Stanovenie počtu probiotík v zmesiach určených k enkapsulácii

Počet probiotických buniek, ktoré boli ďalej enkapsulované, bol stanovený priamym stanovením, konkrétne spočítaním baktérií rozsuspendovaných v 1% roztoku alginátu s vybranými rastlinnými extraktmi s využitím Bürkerovej komôrky a optického mikroskopu (obrázok 22). Zároveň tak bolo overené, či sa v daných extraktoch nenachádza kontaminácia.



Obr. 22: Ukážka *L. acidophilus* (vzorka L1) pri počítaní na Bürkerovej komôrke, zv. 1 000×

Jednotlivé vypočítané hodnoty počtov buniek v zmesiach pripravených na enkapsuláciu podľa vzorca uvedeného v kapitole 4.7.2.1 sú uvedené v tabuľke 23. Z výsledných hodnôt vyplýva, že množstvo buniek v roztokoch bolo primerane dostatočné pre nasledujúcu enkapsuláciu do alginátových častíc.

Tab. 23: Počet probiotických buniek v jednotlivých zmesiach určených k enkapsulácii

Vzorka	Počet buniek [b./ml]	Vzorka	Počet buniek [b./ml]
<b>B1</b>	$1,91 \cdot 10^6 \pm 6$	<b>L1</b>	$1,99 \cdot 10^6 \pm 6$
<b>B2</b>	$2,71 \cdot 10^6 \pm 13$	<b>L2</b>	$2,31 \cdot 10^6 \pm 8$
<b>B3</b>	$2,37 \cdot 10^6 \pm 3$	<b>L3</b>	$1,67 \cdot 10^6 \pm 5$
<b>B4</b>	$3,77 \cdot 10^6 \pm 8$	<b>L4</b>	$2,24 \cdot 10^6 \pm 9$

## 5.5.2 Účinnosť enkapsulácie

Enkapsulačná účinnosť udáva percentuálne vyjadrené množstvo aktívnej látky úspešne inkorporovanej do daných častíc. V tomto prípade bola sledovaná enkapsulačná účinnosť probiotík, resp. životaschopných probiotických baktérií a taktiež fenolických látok ako biologicky aktívnych zložiek rastlín.

### 5.5.2.1 Enkapsulačná účinnosť probiotík

Pre toto stanovenie bol porovnaný počet probiotík v roztoku alginátu pred enkapsuláciou s množstvom probiotických baktérií vo vytvrdzovacom roztoku. Analogicky ako v kapitole 5.5.1 bol počet buniek určený priamym stanovením počítaním pomocou Bürkerovej komôrky a optického mikroskopu.

V jednotlivých vzorkách bol počet neúspešne enkapsulovaných probiotík zanedbateľný a enkapsulačná účinnosť probiotík činila pre všetky vzorky viac ako 99 %.

### 5.5.2.2 Enkapsulačná účinnosť fenolických látok

Porovnaním obsahu fenolických látok v zmesi určenej k enkapsulácii a následne po prevedení enkapsulácie v danom vytvrdzovacom roztoku bola vyhodnotená enkapsulačná účinnosť fenolických látok v jednotlivých časticiach. Výsledky sú zhrnuté v tabuľke 24.

Tab. 24: Obsah fenolických zložiek v pripravených časticiach a enkapsulačná účinnosť (EU) fenolických látok

Vzorka	Enkapsulované fenolické látky [mg/g častíc]	EU [%]	Vzorka	Enkapsulované fenolické látky [mg/g častíc]	EU [%]
<b>B1</b>	$0,56 \pm 0,149$	$34,6 \pm 0,30$	<b>L1</b>	$0,12 \pm 0,010$	$10,0 \pm 0,31$
<b>B2</b>	$0,14 \pm 0,039$	$23,1 \pm 0,26$	<b>L2</b>	$0,10 \pm 0,018$	$15,2 \pm 0,24$
<b>B3</b>	$0,36 \pm 0,143$	$27,7 \pm 0,25$	<b>L3</b>	$0,76 \pm 0,091$	$38,5 \pm 0,31$

Z výsledkov je znateľné, že enkapsulačná účinnosť nestabilných fenolických látok bola pomerne nízka a viac ako polovica nebola úspešne enkapsulovaná. V prípade koenkapsulácie s *B. breve* bola najvyššia enkapsulačná účinnosť u extraktu mäty (B1) dosahujúca približne 35 %. U vzoriek s *L. acidophilus* bol najlepšie enkapsulovaný škoricový extrakt s hodnotou takmer 40 %.

Zvýšenie enkapsulačnej účinnosti nestabilných biologicky aktívnych látok s fenolickou štruktúrou by mohlo byť prevedené upravením podmienok pri enkapsulácii, napríklad dlhším pôsobením vytvrdzovacieho roztoku. To by však mohlo negatívne ovplyvniť viabilitu probiotických buniek v časticiach. Z dlhodobého hľadiska s cieľom predĺžiť životnosť častíc, zabrániť rozpadu či difundácii prchavých fytochemikálií, by bolo možné častice dodatočne upraviť vhodným konzervačným procesom ako napríklad lyofilizáciou alebo pokrytím častíc ochrannou vrstvou vhodného polyméru (napr. chitosanu).

### 5.5.3 Analýza enkapsulovaných častíc pri prechode modelovou tráviacou sústavou

Pre otestovanie pripravených častíc v priebehu trávenia, ich stability a schopnosti uvoľniť dostatočné množstvo požadovaných látok a probiotík na mieste určenia, tj. v hrubom čreve, boli vystavené pôsobeniu modelových tráviacich štiav podľa návodu v kapitole 4.7.3. Pred samotným vložením do žalúdočnej šťavy boli ešte podrvené, aby bol čo najautentickejší napodobnený proces trávenia vrátane počiatočného rozžutia v ústnej dutine. Tieto umelé podmienky však stále nedokážu úplne kopírovať reálny proces digestie, ktorý je ovplyvnený množstvom individuálnych faktorov v závislosti na samotnom konzumentovi. Ukážka častíc po skončení modelového trávenia sa nachádza na obrázku 23.



Obr. 23: Vzorky častíc po skončení modelového trávenia (zľava: *B. breve* + mäta, *B. breve* + harmanček, *B. breve* + škorica, *B. breve* bez extraktu; *L. acidophilus* + mäta, *L. acidophilus* + harmanček, *L. acidophilus* + škorica, *L. acidophilus* bez extraktu)

#### 5.5.3.1 Stanovenie počtu životaschopných buniek kultivačnou metódou

Po ukončení modelového trávenia častíc bola životaschopnosť probiotík testovaná kultivačnou metódou podľa postupu v kapitole 4.7.3.2. Výsledkom pri použití platňových metód je počet životaschopných mikroorganizmov vyjadrený ako počet jednotiek tvoriacich kolónie (CFU) v 1 ml, resp. v tomto prípade v 1 g vzorky. Výsledné vypočítané množstvo viabilných probiotík po ukončení modelového trávenia z pôvodnej navážky 1 g častíc je zhrnuté v tabuľke 25.

Tab. 25: Výsledné množstvo viabilných buniek po enkapsulácii a po modelovom trávení častíc

Označenie vzorky	Zloženie častíc	Počet buniek [CFU/g častíc]	
		Po enkapsulácii	Po trávení
<b>B1</b>	<i>B. breve</i> + mäta	$1,0 \cdot 10^6 \pm 3,0 \cdot 10^5$	$3,5 \cdot 10^7 \pm 2,5 \cdot 10^6$
<b>B2</b>	<i>B. breve</i> + harmanček	$1,8 \cdot 10^6 \pm 6,3 \cdot 10^5$	$4,1 \cdot 10^7 \pm 1,0 \cdot 10^5$
<b>B3</b>	<i>B. breve</i> + škorica	$1,4 \cdot 10^6 \pm 1,3 \cdot 10^5$	$3,9 \cdot 10^7 \pm 1,0 \cdot 10^5$
<b>B4</b>	<i>B. breve</i>	$1,7 \cdot 10^6 \pm 4,1 \cdot 10^5$	$4,0 \cdot 10^7 \pm 1,0 \cdot 10^6$
<b>L1</b>	<i>L. acidophilus</i> + mäta	$1,2 \cdot 10^6 \pm 3,2 \cdot 10^5$	$4,0 \cdot 10^7 \pm 1,0 \cdot 10^6$
<b>L2</b>	<i>L. acidophilus</i> + harmanček	$1,5 \cdot 10^6 \pm 3,9 \cdot 10^5$	$3,0 \cdot 10^7 \pm 1,0 \cdot 10^6$
<b>L3</b>	<i>L. acidophilus</i> + škorica	$9,7 \cdot 10^5 \pm 2,3 \cdot 10^5$	$8,0 \cdot 10^7 \pm 1,0 \cdot 10^6$
<b>L4</b>	<i>L. acidophilus</i>	$1,1 \cdot 10^6 \pm 4,3 \cdot 10^5$	$6,7 \cdot 10^7 \pm 3,5 \cdot 10^5$

Tento test preukázal, že probiotické baktérie boli schopné v enkapsulovanej forme prežívať, zachovať si svoju životaschopnosť a dokonca i zvýšiť svoj počet, pretože po modelovom trávení bolo vo všetkých vzorkách v 1 grame väčšie množstvo životaschopných buniek ako ihneď po samotnej enkapsulácii. Test bol prevádzaný po 24 hodinách od enkapsulácie. Dá sa tak skonštatovať, že alginátové častice sú vhodnou formou enkapsulácie probiotík i v kombinácii s rastlinnými výťažkami, chrániacou baktérie pred tráviacimi šťavami.

Počet životaschopných baktérií v prítomnosti rastlinných extraktov bol len trochu nižší v porovnaní s časticami obsahujúcimi len probiotiká. Harmanček však podporil nárast u *B. breve* a škorica u *L.*



*acidophilus*. Celkovo výsledné počty buniek zodpovedajú normám vymedzujúcim probiotické prípravky. I po pôsobení tráviacich štiav počet buniek stále presahuje požadovanú hodnotu  $1 \cdot 10^6$  viabilných probiotických buniek. Za týchto modelových podmienok bola stanovená optimálna dávka 1 g pripravených častíc.

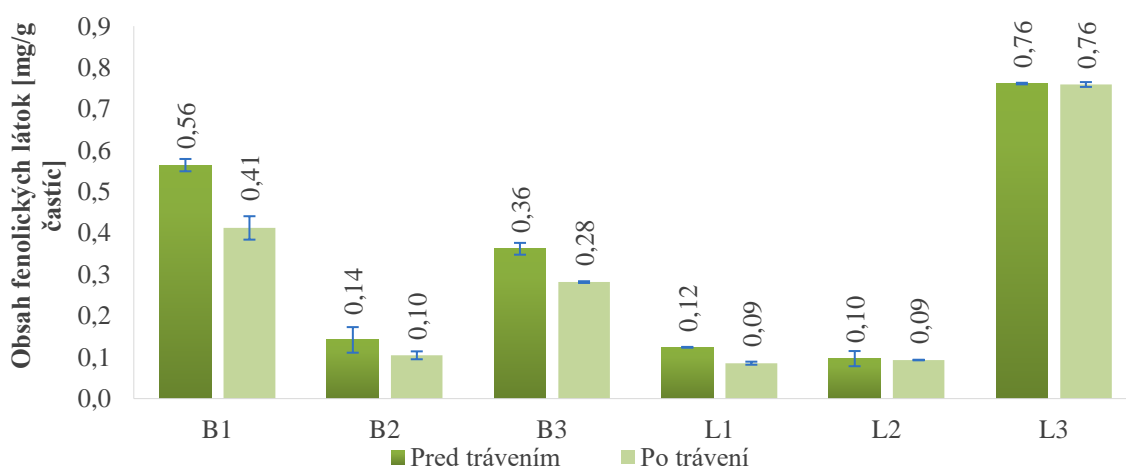
Častice boli testované čerstvé, z hľadiska dlhodobého ovplyvnenia viability enkapsulovaných probiotík bude potrebné previesť nadväzujúce testy.

### 5.5.3.2 Uvoľnené množstvo fenolických látok v priebehu modelového trávenia častíc

Po vystavení pripravených častíc pôsobeniu tráviacich štiav bola z výslednej zmesi odobraná vzorka a stanovené množstvo fenolických látok (podľa návodu v kapitole 4.2.2), ktoré sa uvoľnili v priebehu trávenia a v reálnom procese by sa dostali až do hrubého čreva. Výsledné hodnoty sú v tabuľke 26 a graficky spracované na obrázku 24.

Tab. 26: Zmena množstva fenolických látok v 1 grame častíc v priebehu modelového trávenia

Označenie vzorky	Množstvo fenolických látok pred trávením [mg/g častíc]	Množstvo fenolických látok po trávení [mg/g častíc]	Uvoľnené množstvo fenolických látok
<b>B1</b>	0,56 ± 0,01	0,41 ± 0,03	73,1 %
<b>B2</b>	0,14 ± 0,03	0,10 ± 0,01	73,7 %
<b>B3</b>	0,36 ± 0,01	0,28 ± 0,00	77,8 %
<b>L1</b>	0,12 ± 0,00	0,09 ± 0,00	69,1 %
<b>L2</b>	0,10 ± 0,02	0,09 ± 0,00	96,5 %
<b>L3</b>	0,76 ± 0,00	0,76 ± 0,01	99,7 %



Obr. 24: Porovnanie množstva fenolických látok v časticiach pred a po trávení

Z vypočítaných hodnôt je patrné, že sa u všetkých uvoľnila nadpolovičná väčšina enkapsulovaných fenolických zložiek, v prípade vzorky L3 (*L. acidophilus* + škoricica) prakticky 100 %. Dá sa preto predpokladať, že telo dokáže spracovať väčšinu podanej látky, ktorá by mala byť dostatočne ochránená alginátovou kapsulou pri prechode tráviacim traktom a dostala sa tak až priamo k miestu pôsobenia v hrubom čreve.

Ako najslubnejšie sa javia kombinácie *L. acidophilus* so škoricou a *B. breve* s mäťou. Škoricová príchuť by mohla byť vhodným doplnkom sladších matric, prípadne po lyofilizácii by mohla zaujímavo fortifikovať napr. jablkové pyrė a rôzne kaše. Kapsule s mäťovým výťažkom sa skôr hodia do osviežujúcich nápojov alebo ako prímies do čokolády, čo už však záleží na chuťových preferenciách konzumenta.

## 6 ZÁVER

Cieľom predloženej práce bolo predstaviť návrh synergicky pôsobiaceho probiotického preparátu vhodného pri prevencii a doplnkovej liečbe chronických zápalových stavov predovšetkým tráviacej sústavy. Snahou bolo skombinovať prospešné kmene probiotických baktérií, ktoré sú pri črevnej dysbióze zredukované, s prírodnými protizápalovými zložkami vo vhodnej forme.

Teoretická časť bližšie predstavuje ľudskú črevnú mikrobiotu, jej interakcie s imunitným systémom a komplexné prepojenie s prakticky celým organizmom. Špeciálna kapitola je venovaná načrtnutiu problematiky zápalových procesov a konkrétne i idiopatickým zápalom čriev ako Crohnova choroba či ulcerózna kolitída. Ďalšia časť poskytuje základné informácie o probiotikách a mechanizme ich pôsobenia v organizme. Stručne je zhrnutá i problematika prebiotík a tzv. synbiotických prípravkov. Dôležitým prekurzorom samotnej praktickej časti je časť vymedzujúca známe rastlinné protizápalovo pôsobiace látky, ich chemické a funkčné vlastnosti a predstavujúca i konkrétne rastliny vybrané pre účely tejto práce. Spomenuté sú i škodlivé oxidačné procesy v živých bunkách, ktoré sa tiež významne podieľajú na zápalových procesoch. Ako ochrana pred týmito procesmi slúžia antioxidanty, ktorých hojné zastúpenie sa nachádza práve v rastlinnej ríši. Ich blahodarný vplyv na zdravotný stav sa využíva i v tejto práci. Posledná kapitola teórie bližšie popisuje proces enkapsulácie ako dôležitého procesu v potravinárstve, využitého k zlepšeniu stability a vlastností komplexov probiotík s potenciálne protizápalovo pôsobiacimi rastlinnými výťažkami.

V experimentálnej časti bolo zvolených osem rôznych rastlín s predpokladom žiadúcich vlastností. Konkrétne sa jednalo o brusnicu čučoriedkovú (*Vaccinium myrtillus*), brusnicu pravú (*Vaccinium vitis-idaea*), kurkumu pravú (*Curcuma longa*), mäta piepornú (*Mentha piperita*), rumanček pravý (*Matricaria recutita*), škoricu ceylonskú (*Cinnamomum zeylanicum*), zázvor pravý (*Zingiber officinale*) a ľan siaty (*Linum usitatissimum*). Z vhodných častí týchto rastlín boli pripravené celkom tri druhy extraktov – vodný, etanolový a olejový s využitím hexánu ako extrahovadla. Na základe teoretických poznatkov, ktoré preukázali protizápalové vlastnosti fytochemikálií najmä fenolických zlúčenín a karotenoidov, sa nasledujúce analýzy zameriavali primárne na tieto látky. U pripravených vzoriek bolo stanovené pomocou spektrofotometrických metód celkové množstvo fenolických zložiek, flavonoidov, karotenoidov a celková antioxidačná aktivita. Najvyššie hodnoty fenolických látok vykazovali vodné a etanolové extrakty škorice (cca 50 mg/g vzorky), mäty (cca 35 mg/g vzorky), etanolový extrakt harmančeka (36 mg/g) a olej z kurkumy (28 mg/g oleja), kde sa vyextrahovala predovšetkým hydrofóbná zlúčenina kurkumín. Obsah flavonoidov ako podskupiny fenolických zlúčenín predstavoval viac ako polovicu týchto zlúčenín. Pomocou RP-HPLC analýzy boli ďalej u vybraných vzoriek vodných extraktov stanovené zaujímavé konkrétne biologicky účinné flavonoidy. Najbohatším na protizápalovo pôsobiace flavonoidy sa preukázal harmančekový extrakt. Najvyšší obsah celkových karotenoidov vykazoval olej z kurkumy (až približne 338 563 mg/g oleja), kde sa však jednalo o možnú interferenciu kurkumínom, ktorý nepatrí medzi karotenoidy. Celkovo extrakcia hexánom sa vzhľadom na vlastnosti karotenoidov preukázala ako najvhodnejšia, avšak olejové frakcie by potrebovali iný typ spracovania ako návrh predložený v tejto práci. Stanovenie celkovej antioxidačnej aktivity prakticky kopirovalo obsah fenolických látok, čím bola preukázaná ich antioxidačná významnosť.

K týmto charakteristikám sa neskôr pridalo testovanie vplyvu vzoriek na rast probiotických baktérií. Zvolené boli probiotické baktérie *Bifidobacterium breve* a *Lactobacillus acidophilus*. Pomocou zhodnotenia nárastu zákalu bakteriálnej kultúry po 24 hodinách, boli vylúčené vzorky inhibujúce probiotiká. V ďalšom kroku boli testované všetky rastlinné extrakty spolu s probiotikami v procese modelového trávenia. Účelom bolo zistiť, či niektorý z extraktov nemá v ideálnom prípade pozitívny vplyv na viabilitu baktérií pri prechode tráviacimi šťavami, čo by dopomohlo k doručeniu probiotík do miesta určenia – hrubého čreva. Zo všetkých čiastkových výsledkov boli na základe ich vhodnosti vzhľadom na účel tejto práce vybrané najzaujímavejšie extrakty. Jednalo sa o vodné a etanolové extrakty mäty, harmančeka a škorice a olej extrahovaný zo zázvoru. Z dôvodu širšieho využitia v potravinárskom priemysle a i z ekonomického hľadiska boli pre ďalšie aplikácie zvolené vodné extrakty.

Vo vybraných zaujímavých extraktoch, konkrétne vodnom extrakte čučoriedok, mäty, harmančeku a škorice, bola testovaná cytotoxicita na črevných epiteliálnych bunkách z bunkovej línie CaCo-2. Využitý bol MTT test založený na schopnosti živých buniek redukovať MTT na fialovomodrú zrazeninu formazanu, determinovateľnú spektroskopicky. Vodný extrakt z čučoriedok nevykazoval cytotoxický efekt na ľudské bunky. U ostatných extraktov bola zaznamenaná pomerne významná cytotoxicita pri vyšších koncentráciách extraktov. Pri ďalšom využití extraktov je preto potrebné tento fakt zohľadniť a pri prípadnej konzumácii pripraviť preparáty o koncentracii extraktov neinhibujúcich metabolizmus a viabilitu črevných buniek – u mäty a škorice do 8 % a u harmančeku do 17 %.

Bioaktívne zlúčeniny z extraktov mäty, harmančeku a škorice, a probiotické baktérie boli spoločne enkapsulované do alginátových častíc s využitím 1% roztoku sodnej soli alginátu. U pripravených častíc o priemere 1 mm bola stanovená účinnosť enkapsulácie ako pre probiotiká, tak pre celkové fenolické zložky z extraktov. Enkapsulačná účinnosť probiotík bola u všetkých vzoriek viac ako 99 %, neenkapsulované množstvo bolo prakticky zanedbateľné. Pre fenolické látky bol zvolený proces najefektívnejší pre kombináciu škorice s probiotikom *L. acidophilus*, konkrétne 40 %. V kombinácii s *B. breve* dosiahli najvyššiu hodnotu častice obsahujúce extrakt z mäty. U ďalších vzoriek bola enkapsulačná účinnosť fenolických látok pomerne nízka, čo vyžaduje ďalšiu prípadnú optimalizáciu enkapsulačnej metódy, napr. predĺžením doby pôsobenia vytvrdzovacieho roztoku.

Schopnosť častíc uvoľňovať viabilné probiotické bunky a významné fytochemikálie bola sledovaná v prostredí modelových tráviacich štiav simulujúcich proces trávenia. Viabilita uvoľnených probiotických baktérií bola stanovená pomocou nepriameho stanovenia kultivačnou metódou zaliatím. Po ukončení procesu trávenia boli odobrané vzorky, vhodne nariadené a ponechané kultivovať 48 hodín na pevnom živnom médiu. Táto technika preukázala, že i po trávení sa v pripravených časticiach nachádzali viabilné probiotiká a že im alginátové častice poskytli ochranu pred pôsobením štiav. Preto sa predpokladá, že sa dokážu v dostatočne účinnom množstve dostať až do hrubého čreva. Okrem probiotík bolo stanovené i množstvo uvoľnených fenolických látok. Pohybovalo sa v rozmedzí 70–100 %. To je opäť vhodným predpokladom pre efektívne dopravenie biologicky aktívnych látok na miesto určenia. Na základe týchto stanovení bola navrhnutá doporučená vhodná dávka 1 g pripravených častíc, čo predstavuje približne 1 čajovú lyžičku.

V ďalšej práci by bolo vhodné otestovať rôzne kombinácie ako probiotických kultúr, tak i extraktov. Ďalej by bolo potrebné stanoviť dlhodobú stabilitu častíc a navrhnuť prípadné ďalšie metódy jej zvýšenia ako napr. lyofilizácia častíc, či pokrytie ochrannou vrstvičkou. Pri implementácii do potravinárstva by bolo vhodné prípadne zvýšiť organoleptické vlastnosti častíc kombináciou s vhodnou potravinovou maticou, napr. čokoládou, jogurtom, a pod. V prípade potreby zamaskovania nepríjemných horkastých pachutí extraktov a alginátu by bolo možné pridať sladidlo, napr. zo stévie.

V prípade výživového doplnku používaného pri podpore liečby zápalových ochorení čriev by bolo pri príprave komplexnejšieho prípravku vhodné obohatiť o prípadné vitamíny a minerály, ktoré pri týchto stavoch zníženej schopnosti vstrebávať živiny z potravy telu chýbajú. Rôzne chemické vlastnosti takýchto látok však vyžadujú prípadné úpravy enkapsulačného procesu. Taktiež je potrebné previesť doplnkové štúdie preukazujúce ovplyvnenie zápalových procesov kompletným výsledným preparátom.

## 7 ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

- [1] NEISH A. S. *Microbes in Gastrointestinal Health and Disease*. Gastroenterology [online]. 2009. 136 (1): 65–80 [cit. 13. 11. 2019]. DOI:10.1053/j.gastro.2008.10.080.
- [2] SAMPSON T. R., DEBELIUS J. W., THRON T., JANSSEN S., SHASTRI G. G., ILHAN Z. E., CHALLIS C., SCHRETTTER C. E., ROCHA S., GRADINARU V., CHESSELET M.-F., KESHAVARZIAN A., SHANNON K. M., KRAJMALNIK-BROWN R., WITTUNG-STAFSHEDE P., KNIGHT R., MAZMANIAN S. K. *Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease*. Cell [online]. 2016. 167 (6): 1469–1480 [cit. 22. 10. 2019]. DOI:10.1016/j.cell.2016.11.018.
- [3] ATARASHI K., TANOUE T., OSHIMA K., SUDA W., NAGANO Y., NISHIKAWA H., FUKUDA S., SAITO T., NARUSHIMA S., HASE K., KIM S., FRITZ J. V., WILMES P., UEHA S., MATSUSHIMA K., OHNO H., OLLE B., SAKAGUCHI S., TANIGUCHI T., MORITA H., HATTORI M., HONDA K. *Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota*. Nature [online]. 2013. 500 (7461): 232–236 [cit. 5. 1. 2020]. DOI:10.1038/nature12331.
- [4] RHEE S. H., POTHOUKAKIS C., MAYER E. A. *Principles and clinical implications of the brain–gut–enteric microbiota axis*. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology [online]. 2009. 6 (5): 306–314 [cit. 11. 1. 2020]. DOI:10.1038/nrgastro.2009.35.
- [5] FORSYTHE P., SUDO N., DINAN T., TAYLOR V. H., BIENENSTOCK J. *Mood and gut feelings*. Brain, Behavior, and Immunity [online]. 2010. 24 (1): 9–16 [cit. 11. 1. 2020]. DOI:10.1016/j.bbi.2009.05.058.
- [6] NEUFELD K. A., FOSTER J. A. *Effects of gut microbiota on the brain: Implications for psychiatry*. B.m., Canadian Medical Association. 2009
- [7] BERCIK P., DENOUE E., COLLINS J., JACKSON W., LU J., JURY J., DENG Y., BLENNERHASSETT P., MACRI J., MCCOY K. D., VERDU E. F., COLLINS S. M. *The Intestinal Microbiota Affect Central Levels of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Behavior in Mice*. Gastroenterology [online]. 2011. 141 (2): 599-609.e3 [cit. 4. 1. 2020]. DOI:10.1053/j.gastro.2011.04.052.
- [8] YANO J. M., YU K., DONALDSON G. P., SHASTRI G. G., ANN P., MA L., NAGLER C. R., ISMAGILOV R. F., MAZMANIAN S. K., HSIAO E. Y. *Indigenous Bacteria from the Gut Microbiota Regulate Host Serotonin Biosynthesis*. Cell [online]. 2015. 161 (2): 264–276 [cit. 6. 1. 2020]. DOI:10.1016/j.cell.2015.02.047.
- [9] BACKHED F., DING H., WANG T., HOOPER L. V., KOH G. Y., NAGY A., SEMENKOVICH C. F., GORDON J. I. *The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage*. Proceedings of the National Academy of Sciences [online]. 2004. 101 (44): 15718–15723 [cit. 5. 1. 2020]. DOI:10.1073/pnas.0407076101.
- [10] TURNBAUGH P. J., LEY R. E., MAHOWALD M. A., MAGRINI V., MARDIS E. R., GORDON J. I. *An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest*. Nature [online]. 2006. 444 (7122): 1027–1031. DOI:10.1038/nature05414.
- [11] KANG Y., ZHANG X., CAI Y., SU J., KONG X. *Gut microbiota and metabolic disease*. Reviews in Medical Microbiology [online]. 2016. 27 (4): 141–152. DOI:10.1097/MRM.0000000000000085.
- [12] NOVERRI M. C., HUFFNAGLE G. B. *The “microflora hypothesis” of allergic diseases*. Clinical & Experimental Allergy [online]. 2005. 35 (12): 1511–1520 [cit. 11. 1. 2020]. DOI:10.1111/j.1365-2222.2005.02379.x.
- [13] HSIAO E. Y., MCBRIDE S. W., HSIEN S., SHARON G., HYDE E. R., MCCUE T., CODELLI J. A., CHOW J., REISMAN S. E., PETROSINO J. F., PATTERSON P. H., MAZMANIAN S. K. *Microbiota Modulate Behavioral and Physiological Abnormalities Associated with Neurodevelopmental Disorders*. Cell [online]. 2013. 155 (7): 1451–1463 [cit. 6. 1. 2020]. DOI:10.1016/j.cell.2013.11.024.
- [14] COLLINS S. M., BERCIK P. *The Relationship Between Intestinal Microbiota and the Central Nervous System in Normal Gastrointestinal Function and Disease*. Gastroenterology [online]. 2009. 136 (6): 2003–2014 [cit. 11. 1. 2020]. DOI:10.1053/j.gastro.2009.01.075.
- [15] HEIJTZ R. D., WANG S., ANUAR F., QIAN Y., BJÖRKHOLM B., SAMUELSSON A.,

- HIBBERD M. L., FORSSBERG H., PETTERSSON S. *Normal gut microbiota modulates brain development and behavior*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America [online]. 2011. 108 (7): 3047–3052. DOI:10.1073/pnas.1010529108.
- [16] FUNG T. C., OLSON C. A., HSIAO E. Y. *Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease*. Nature Neuroscience [online]. 2017. 20 (2): 145–155. DOI:10.1038/nn.4476.
- [17] LEY R. E., PETERSON D. A., GORDON J. I. *Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine* [online]. 2006. DOI:10.1016/j.cell.2006.02.017.
- [18] DEWHIRST F. E., CHEN T., IZARD J., PASTER B. J., TANNER A. C. R., YU W.-H., LAKSHMANAN A., WADE W. G. *The Human Oral Microbiome*. Journal of Bacteriology [online]. 2010. 192 (19): 5002–5017 [cit. 14. 1. 2020]. DOI:10.1128/JB.00542-10.
- [19] AAS J. A., PASTER B. J., STOKES L. N., OLSEN I., DEWHIRST F. E. *Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity*. Journal of Clinical Microbiology [online]. 2005. 43 (11): 5721–5732 [cit. 14. 1. 2020]. DOI:10.1128/JCM.43.11.5721-5732.2005.
- [20] AVILA M., OJCIUS D. M., YILMAZ Ö. *The Oral Microbiota: Living with a Permanent Guest*. DNA and Cell Biology [online]. 2009. 28 (8): 405–411 [cit. 14. 1. 2020]. DOI:10.1089/dna.2009.0874.
- [21] ECKBURG P. B. *Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora*. Science [online]. 2005. 308 (5728): 1635–1638 [cit. 11. 1. 2020]. DOI:10.1126/science.1110591.
- [22] GORDON J. H., DUBOS R. *The anaerobic bacterial flora of the mouse cecum*. Journal of Experimental Medicine [online]. 1970. 132 (2): 251–260. DOI:10.1084/jem.132.2.251.
- [23] QUIGLEY E. M. M., EAMONN D., QUIGLEY M. M. *Gut Bacteria in Health and Disease*. 2013.
- [24] ARUMUGAM M., RAES J., PELLETIER E., LE PASLIER D., YAMADA T., MENDE D. R., FERNANDES G. R., TAP J., BRULS T., BATTO J.-M., BERTALAN M., BORRUEL N., CASELLAS F., FERNANDEZ L., GAUTIER L., HANSEN T., HATTORI M., HAYASHI T., KLEEREBEZEM M., KUROKAWA K., LECLERC M., LEVENEZ F., MANICHANH C., NIELSEN H. B., NIELSEN T., PONS N., POULAIN J., QIN J., SICHERITZ-PONTEN T., TIMS S., TORRENTS D., UGARTE E., ZOETENDAL E. G., WANG J., GUARNER F., PEDERSEN O., DE VOS W. M., BRUNAK S., DORÉ J., WEISSENBACH J., EHRLICH S. D., BORK P. *Enterotypes of the human gut microbiome*. Nature [online]. 2011. 473 (7346): 174–180 [cit. 14. 1. 2020]. DOI:10.1038/nature09944.
- [25] SALYERS A. A., VERCELLOTTI J. R., WEST S. E. H., WILKINS T. D. *Fermentation of mucin and plant polysaccharides by strains of Bacteroides from the human colon*. Applied and Environmental Microbiology. 1977. 33 (2): 319–322.
- [26] JOHANSSON M. E. V., PHILLIPSON M., PETERSSON J., VELCICH A., HOLM L., HANSSON G. C. *The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria*. Proceedings of the National Academy of Sciences [online]. 2008. 105 (39): 15064–15069 [cit. 11. 1. 2020]. DOI:10.1073/pnas.0803124105.
- [27] SWIDSINSKI A. *Spatial organization of bacterial flora in normal and inflamed intestine: A fluorescence in situ hybridization study in mice*. World Journal of Gastroenterology [online]. 2005. 11 (8): 1131 [cit. 11. 1. 2020]. DOI:10.3748/wjg.v11.i8.1131.
- [28] SARTOR R. B. *Microbial Influences in Inflammatory Bowel Diseases*. Gastroenterology [online]. 2008. 134 (2): 577–594. DOI:10.1053/j.gastro.2007.11.059.
- [29] HAVENAAR R. *Intestinal health functions of colonic microbial metabolites: a review*. Beneficial Microbes [online]. 2011. 2 (2): 103–114 [cit. 3. 1. 2020]. DOI:10.3920/BM2011.0003.
- [30] MACFARLANE G. T., MACFARLANE S. *Bacteria, Colonic Fermentation, and Gastrointestinal Health*. Journal of AOAC International [online]. 2012. 95 (1): 50–60 [cit. 3. 1. 2020]. DOI:10.5740/jaoacint.SGE\_Macfarlane.
- [31] HAMER H. M., JONKERS D., VENEMA K., VANHOUTVIN S., TROOST F. J., BRUMMER R.-J. *Review article: the role of butyrate on colonic function*. Alimentary Pharmacology & Therapeutics [online]. 2007. 27 (2): 104–119 [cit. 3. 1. 2020]. DOI:10.1111/j.1365-2036.2007.03562.x.
- [32] KOH A., DE VADDER F., KOVATCHEVA-DATCHARY P., BÄCKHED F. *From Dietary*

- Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites*. Cell [online]. 2016. 165 (6): 1332–1345 [cit. 3. 1. 2020]. DOI:10.1016/j.cell.2016.05.041.
- [33] HIJOVA E., CHMELAROVA A. *Short chain fatty acids and colonic health*. Bratislavské lekárske listy. 2007. 108 (8): 354–358.
- [34] VERBEKE K. A., BOOBIS A. R., CHIODINI A., EDWARDS C. A., FRANCK A., KLEEREBEZEM M., NAUTA A., RAES J., VAN TOL E. A. F., TUOHY K. M. *Towards microbial fermentation metabolites as markers for health benefits of prebiotics*. Nutrition Research Reviews [online]. 2015. 28 (1): 42–66 [cit. 3. 1. 2020]. DOI:10.1017/S0954422415000037.
- [35] WINDEY K., DE PRETER V., VERBEKE K. *Relevance of protein fermentation to gut health*. Molecular Nutrition & Food Research [online]. 2012. 56 (1): 184–196 [cit. 14. 1. 2020]. DOI:10.1002/mnfr.201100542.
- [36] BIRKETT A., MUIR J., PHILLIPS J., JONES G., O’DEA K. *Resistant starch lowers fecal concentrations of ammonia and phenols in humans*. The American Journal of Clinical Nutrition [online]. 1996. 63 (5): 766–772 [cit. 14. 1. 2020]. DOI:10.1093/ajcn/63.5.766.
- [37] SMITH E. A., MACFARLANE G. T. *Enumeration of human colonic bacteria producing phenolic and indolic compounds: effects of pH, carbohydrate availability and retention time on dissimilatory aromatic amino acid metabolism*. Journal of Applied Bacteriology [online]. 1996. 81 (3): 288–302 [cit. 14. 1. 2020]. DOI:10.1111/j.1365-2672.1996.tb04331.x.
- [38] EL OUFIR L., BARRY J., FLOURIÉ B., CHERBUT C., CLOAREC D., BORNET F., GALMICHE J. *Relationships between transit time in man and in vitro fermentation of dietary fiber by fecal bacteria*. European Journal of Clinical Nutrition [online]. 2000. 54 (8): 603–609 [cit. 15. 1. 2020]. DOI:10.1038/sj.ejcn.1600687.
- [39] SCOTT K. P., GRATZ S. W., SHERIDAN P. O., FLINT H. J., DUNCAN S. H. *The influence of diet on the gut microbiota*. Pharmacological Research [online]. 2013. 69 (1): 52–60 [cit. 15. 1. 2020]. DOI:10.1016/j.phrs.2012.10.020.
- [40] MACFARLANE G. T., MACFARLANE S. *Fermentation in the Human Large Intestine*. Journal of Clinical Gastroenterology [online]. 2011. 45 : S120–S127 [cit. 15. 1. 2020]. DOI:10.1097/MCG.0b013e31822fecfe.
- [41] DE KEERSMAECKER S. C. J., VERHOEVEN T. L. A., DESAIR J., MARCHAL K., VANDERLEYDEN J., NAGY I. *Strong antimicrobial activity of Lactobacillus rhamnosus GG against Salmonella typhimurium is due to accumulation of lactic acid*. FEMS Microbiology Letters [online]. 2006. 259 (1): 89–96 [cit. 12. 1. 2020]. DOI:10.1111/j.1574-6968.2006.00250.x.
- [42] MAKRAS L., TRIANTAFYLLOU V., FAYOL-MESSAOUDI D., ADRIANY T., ZOUMPOPOULOU G., TSAKALIDOU E., SERVIN A., DE VUYST L. *Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards Salmonella enterica serovar Typhimurium reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds*. Research in Microbiology [online]. 2006. 157 (3): 241–247 [cit. 12. 1. 2020]. DOI:10.1016/j.resmic.2005.09.002.
- [43] VALCHEVA R., DIELEMAN L. A. *Prebiotics: Definition and protective mechanisms*. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology [online]. 2016. 30 (1): 27–37 [cit. 3. 1. 2020]. DOI:10.1016/j.bpg.2016.02.008.
- [44] BALAMURUGAN R., RAJENDIRAN E., GEORGE S., SAMUEL G. V., RAMAKRISHNA B. S. *Real-time polymerase chain reaction quantification of specific butyrate-producing bacteria, Desulfovibrio and Enterococcus faecalis in the feces of patients with colorectal cancer*. Journal of Gastroenterology and Hepatology [online]. 2008. 23 (8pt1): 1298–1303 [cit. 5. 1. 2020]. DOI:10.1111/j.1440-1746.2008.05490.x.
- [45] MACFARLANE S., MACFARLANE G. T. *Regulation of short-chain fatty acid production*. Proceedings of the Nutrition Society [online]. 2003. 62 (1): 67–72 [cit. 14. 1. 2020]. DOI:10.1079/PNS2002207.
- [46] MILLS E., O’NEILL L. A. J. *Succinate: a metabolic signal in inflammation*. Trends in Cell Biology [online]. 2014. 24 (5): 313–320 [cit. 14. 1. 2020]. DOI:10.1016/j.tcb.2013.11.008.
- [47] HUDA-FAUJAN N., ABDULAMIR A. S., FATIMAH A. B., ANAS O. M., SHUHAIMI M., YAZID A. M., LOONG Y. Y. *The Impact of the Level of the Intestinal Short Chain Fatty Acids in Inflammatory Bowel Disease Patients Versus Healthy Subjects*. The Open Biochemistry

- Journal [online]. 2010. 4 : 53–58 [cit. 14. 1. 2020]. DOI:10.2174/1874091X01004010053.
- [48] MURRAY M. J., GONZE M. D., NOWAK L. R., COBB C. F. *Serum D(-)-lactate levels as an aid to diagnosing acute intestinal ischemia*. The American Journal of Surgery [online]. 1994. 167 (6): 575–578 [cit. 14. 1. 2020]. DOI:10.1016/0002-9610(94)90101-5.
- [49] DUZGUN A. P., BUGDAYCI G., SAYIN B., OZMEN M. M., OZER M. V., COSKUN F. *Serum D-lactate: a useful diagnostic marker for acute appendicitis*. Hepato-gastroenterology [online]. no date. 54 (77): 1483–6 [cit. 14. 1. 2020]. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17708281>>
- [50] HOVE H., MORTENSEN P. B. *Influence of intestinal inflammation (IBD) and small and large bowel length on fecal short-chain fatty acids and lactate*. Digestive Diseases and Sciences [online]. 1995. 40 (6): 1372–1380 [cit. 14. 1. 2020]. DOI:10.1007/BF02065554.
- [51] MARQUET P., DUNCAN S. H., CHASSARD C., BERNALIER-DONADILLE A., FLINT H. J. *Lactate has the potential to promote hydrogen sulphide formation in the human colon*. FEMS Microbiology Letters [online]. 2009. 299 (2): 128–134 [cit. 14. 1. 2020]. DOI:10.1111/j.1574-6968.2009.01750.x.
- [52] COTTER P. D., HILL C., ROSS R. P. *Food microbiology: Bacteriocins: Developing innate immunity for food* [online]. október 2005. DOI:10.1038/nrmicro1273.
- [53] LAWTON E., ROSS R., HILL C., COTTER P. *Two-Peptide Lantibiotics: A Medical Perspective*. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry [online]. 2007. 7 (12): 1236–1247 [cit. 12. 1. 2020]. DOI:10.2174/138955707782795638.
- [54] COLLADO M. C., HERNÁNDEZ M., SANZ Y. *Production of Bacteriocin-Like Inhibitory Compounds by Human Fecal Bifidobacterium Strains*. Journal of Food Protection [online]. 2005. 68 (5): 1034–1040 [cit. 12. 1. 2020]. DOI:10.4315/0362-028X-68.5.1034.
- [55] BRAVO J. A., FORSYTHE P., CHEW M. V., ESCARAVAGE E., SAVIGNAC H. M., DINAN T. G., BIENENSTOCK J., CRYAN J. F. *Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve*. Proceedings of the National Academy of Sciences [online]. 2011. 108 (38): 16050–16055 [cit. 15. 1. 2020]. DOI:10.1073/pnas.1102999108.
- [56] KANG Y., CAI Y. *Gut microbiota and depression*. Reviews in Medical Microbiology [online]. 2017. 28 (2): 56–62. DOI:10.1097/MRM.000000000000103.
- [57] LEBLANC J. G., MILANI C., DE GIORI G. S., SESMA F., VAN SINDEREN D., VENTURA M. *Bacteria as vitamin suppliers to their host: A gut microbiota perspective*. Current Opinion in Biotechnology [online]. 2013. 24 (2): 160–168. DOI:10.1016/j.copbio.2012.08.005.
- [58] SAID H. M. *Intestinal absorption of water-soluble vitamins in health and disease* [online]. 1. august 2011. DOI:10.1042/BJ20110326.
- [59] RIORDAN S. M., WILLIAMS R. *Gut Flora and Hepatic Encephalopathy in Patients with Cirrhosis*. New England Journal of Medicine [online]. 2010. 362 (12): 1140–1142 [cit. 4. 1. 2020]. DOI:10.1056/NEJMe1000850.
- [60] WANG Z., KLIPFELL E., BENNETT B. J., KOETH R., LEVISON B. S., DUGAR B., FELDSTEIN A. E., BRITT E. B., FU X., CHUNG Y.-M., WU Y., SCHAUER P., SMITH J. D., ALLAYEE H., TANG W. H. W., DIDONATO J. A., LUSIS A. J., HAZEN S. L. *Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease*. Nature [online]. 2011. 472 (7341): 57–63 [cit. 4. 1. 2020]. DOI:10.1038/nature09922.
- [61] KOETH R. A., WANG Z., LEVISON B. S., BUFFA J. A., ORG E., SHEEHY B. T., BRITT E. B., FU X., WU Y., LI L., SMITH J. D., DIDONATO J. A., CHEN J., LI H., WU G. D., LEWIS J. D., WARRIER M., BROWN J. M., KRAUSS R. M., TANG W. H. W., BUSHMAN F. D., LUSIS A. J., HAZEN S. L. *Intestinal microbiota metabolism of l-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis*. Nature Medicine [online]. 2013. 19 (5): 576–585 [cit. 4. 1. 2020]. DOI:10.1038/nm.3145.
- [62] LESCELLE X., GOUBERN M., ANDRIAMIHAJA M., BLOTTIÈRE H. M., COUPLAN E., GONZALEZ-BARROSO M.-M., PETIT C., PAGNIEZ A., CHAUMONTET C., MIGNOTTE B., BOUILLAUD F., BLACHIER F. *Adaptative metabolic response of human colonic epithelial cells to the adverse effects of the luminal compound sulfide*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects [online]. 2005. 1725 (2): 201–212 [cit. 15. 1. 2020]. DOI:10.1016/j.bbagen.2005.06.002.

- [63] MEDANI M., COLLINS D., DOCHERTY N. G., BAIRD A. W., O'CONNELL P. R., WINTER D. C. *Emerging role of hydrogen sulfide in colonic physiology and pathophysiology*. *Inflammatory Bowel Diseases* [online]. 2011. 17 (7): 1620–1625 [cit. 15. 1. 2020]. DOI:10.1002/ibd.21528.
- [64] DE PRETER V., ARIJS I., WINDEY K., VANHOVE W., VERMEIRE S., SCHUIT F., RUTGEERTS P., VERBEKE K. *Decreased mucosal sulfide detoxification is related to an impaired butyrate oxidation in ulcerative colitis*. *Inflammatory Bowel Diseases* [online]. 2012. 18 (12): 2371–2380 [cit. 15. 1. 2020]. DOI:10.1002/ibd.22949.
- [65] ATTENE-RAMOS M. S., NAVA G. M., MUELLNER M. G., WAGNER E. D., PLEWA M. J., GASKINS H. R. *DNA damage and toxicogenomic analyses of hydrogen sulfide in human intestinal epithelial FHs 74 Int cells*. *Environmental and Molecular Mutagenesis* [online]. 2010. NA-NA [cit. 15. 1. 2020]. DOI:10.1002/em.20546.
- [66] BLACHIER F., DAVILA A.-M., MIMOUN S., BENETTI P.-H., ATANASIU C., ANDRIAMIHAJA M., BENAMOUGIZ R., BOUILLAUD F., TOMÉ D. *Luminal sulfide and large intestine mucosa: friend or foe?*. *Amino Acids* [online]. 2010. 39 (2): 335–347 [cit. 15. 1. 2020]. DOI:10.1007/s00726-009-0445-2.
- [67] SMITH E. ., MACFARLANE G. . *Dissimilatory Amino Acid Metabolism in Human Colonic Bacteria*. *Anaerobe* [online]. 1997. 3 (5): 327–337 [cit. 15. 1. 2020]. DOI:10.1006/anae.1997.0121.
- [68] BLACHIER F., MARIOTTI F., HUNEAU J. F., TOMÉ D. *Effects of amino acid-derived luminal metabolites on the colonic epithelium and physiopathological consequences*. *Amino Acids* [online]. 2007. 33 (4): 547–562 [cit. 15. 1. 2020]. DOI:10.1007/s00726-006-0477-9.
- [69] WANG L., CHRISTOPHERSEN C. T., SORICH M. J., GERBER J. P., ANGLELY M. T., CONLON M. A. *Elevated Fecal Short Chain Fatty Acid and Ammonia Concentrations in Children with Autism Spectrum Disorder*. *Digestive Diseases and Sciences* [online]. 2012. 57 (8): 2096–2102 [cit. 15. 1. 2020]. DOI:10.1007/s10620-012-2167-7.
- [70] MEDZHITOV R. *Origin and physiological roles of inflammation*. *Nature* [online]. 2008. 454 (7203): 428–435 [cit. 5. 12. 2019]. DOI:10.1038/nature07201.
- [71] ASHLEY N. T., WEIL Z. M., NELSON R. J. *Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation*. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* [online]. 2012. 43 (1): 385–406 [cit. 5. 12. 2019]. DOI:10.1146/annurev-ecolsys-040212-092530.
- [72] KUMAR V., ABBAS A. K., ASTER J. C., ROBBINS S. L. 9th vyd. *Robbins basic pathology*. 2013. Philadelphia, PA, Elsevier.
- [73] CARIO E. *Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2* [online]. august 2005. DOI:10.1136/gut.2004.062794.
- [74] HUGHES, ROBERT FRIEDMAN A. L. *Molecular evolution of the NF- $\kappa$ B signaling system*. *Immunogenetics* [online]. 2002. 53 (10–11): 964–974 [cit. 5. 12. 2019]. DOI:10.1007/s00251-001-0399-3.
- [75] PROELL M., RIEDL S. J., FRITZ J. H., ROJAS A. M., SCHWARZENBACHER R. *The Nod-Like Receptor (NLR) Family: A Tale of Similarities and Differences*. *PLoS ONE* [online]. 2008. 3 (4) [cit. 5. 12. 2019]. DOI:10.1371/journal.pone.0002119.
- [76] ROCK K. L., KONO H. *The Inflammatory Response to Cell Death*. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* [online]. 2008. 3 (1): 99–126 [cit. 5. 12. 2019]. DOI:10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151456.
- [77] MURPHY K., TRAVERS P., WALPORT M., JANEWAY C. 7. *Janeway's Immunobiology*. 2008. New York, Garland Science.
- [78] ABREU M. T., FUKATA M., ARDITI M. *TLR Signaling in the Gut in Health and Disease*. *The Journal of Immunology* [online]. 2005. 174 (8): 4453–4460 [cit. 22. 1. 2020]. DOI:10.4049/jimmunol.174.8.4453.
- [79] MAGALHAES J. G., TATTOLI I., GIRARDIN S. E. *The intestinal epithelial barrier: How to distinguish between the microbial flora and pathogens*. *Seminars in Immunology* [online]. 2007. 19 (2): 106–115 [cit. 22. 1. 2020]. DOI:10.1016/j.smim.2006.12.006.
- [80] ISMAIL A. S., HOOPER L. V. *Epithelial Cells and Their Neighbors. IV. Bacterial contributions to intestinal epithelial barrier integrity*. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* [online]. 2005. 289 (5): G779–G784 [cit. 22. 1. 2020].



- DOI:10.1152/ajpgi.00203.2005.
- [81] KIM J. G., LEE S. J., KAGNOFF M. F. *Nod1 Is an Essential Signal Transducer in Intestinal Epithelial Cells Infected with Bacteria That Avoid Recognition by Toll-Like Receptors*. *Infection and Immunity* [online]. 2004. 72 (3): 1487–1495 [cit. 22. 1. 2020]. DOI:10.1128/IAI.72.3.1487-1495.2004.
- [82] BOLAND C. R. *Infection, inflammation and gastrointestinal cancer*. *Gut* [online]. 2005. 54 (9): 1321–1331 [cit. 13. 11. 2019]. DOI:10.1136/gut.2004.060079.
- [83] HAWKEY C. J. *Non-steroidal anti-inflammatory drugs: overall risks and management. Complementary roles for COX-2 inhibitors and proton pump inhibitors*. *Gut* [online]. 2003. 52 (4): 600–608 [cit. 5. 12. 2019]. DOI:10.1136/gut.52.4.600.
- [84] TAMBLYN R. *Unnecessary Prescribing of NSAIDs and the Management of NSAID-Related Gastropathy in Medical Practice*. *Annals of Internal Medicine* [online]. 1997. 127 (6): 429 [cit. 5. 12. 2019]. DOI:10.7326/0003-4819-127-6-199709150-00003.
- [85] BOUMA G., STROBER W. *The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease*. *Nature Reviews Immunology* [online]. 2003. 3 (7): 521–533 [cit. 2. 1. 2020]. DOI:10.1038/nri1132.
- [86] BOUMA G., STROBER W. *The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease*. *Nature Reviews Immunology* [online]. 2003. 3 (7): 521–533 [cit. 2. 1. 2020]. DOI:10.1038/nri1132.
- [87] BAMIAS G., NYCE M. R., DE S. A., RUE L., COMINELLI F. *New Concepts in the Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease*. *Annals of Internal Medicine* [online]. 2005. 143 (12): 895–904 [cit. 2. 1. 2020]. Available at: <www.annals.org>
- [88] FRITZ T., NIEDERREITER L., ADOLPH T., BLUMBERG R. S., KASER A. *Crohn's disease: NOD2, autophagy and ER stress converge*. *Gut* [online]. 2011. 60 (11): 1580–1588 [cit. 22. 1. 2020]. DOI:10.1136/gut.2009.206466.
- [89] TÖRÖK H.-P., GLAS J., TONENCHI L., BRUENNLER G., FOLWACZNY M., FOLWACZNY C. *Crohn's disease is associated with a toll-like receptor-9 polymorphism*. *Gastroenterology* [online]. 2004. 127 (1): 365–366 [cit. 22. 1. 2020]. DOI:10.1053/j.gastro.2004.05.051.
- [90] PIERIK M., JOOSSENS S., VAN STEEN K., VAN SCHUERBEEK N., VLIETINCK R., RUTGEERTS P., VERMEIRE S. *Toll-like receptor-1, -2, and -6 polymorphisms influence disease extension in inflammatory bowel diseases*. *Inflammatory Bowel Diseases* [online]. 2006. 12 (1): 1–8 [cit. 22. 1. 2020]. DOI:10.1097/01.MIB.0000195389.11645.ab.
- [91] DUERR R. H., TAYLOR K. D., BRANT S. R., RIOUX J. D., SILVERBERG M. S., DALY M. J., STEINHART A. H., ABRAHAM C., REGUEIRO M., GRIFFITHS A., DASSOPOULOS T., BITTON A., YANG H., TARGAN S., DATTA L. W., KISTNER E. O., SCHUMM L. P., LEE A. T., GREGERSEN P. K., BARMADA M. M., ROTTER J. I., NICOLAE D. L., CHO J. H. *A Genome-Wide Association Study Identifies IL23R as an Inflammatory Bowel Disease Gene*. *Science* [online]. 2006. 314 (5804): 1461–1463 [cit. 12. 1. 2020]. DOI:10.1126/science.1135245.
- [92] HAMPE J., CUTHBERT A., CROUCHER P. J. P., MIRZA M. M., MASCHERETTI S., FISHER S., FRENZEL H., KING K., HASSELMAYER A., MACPHERSON A. J. S., BRIDGER S., VAN DEVENTER S., FORBES A., NIKOLAUS S., LENNARD-JONES J. E., FOELSCH U. R., KRAWCZAK M., LEWIS C., SCHREIBER S., MATHEW C. G. *Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations*. *The Lancet* [online]. 2001. 357 (9272): 1925–1928 [cit. 12. 1. 2020]. DOI:10.1016/S0140-6736(00)05063-7.
- [93] PETERSON D. A., FRANK D. N., PACE N. R., GORDON J. I. *Metagenomic Approaches for Defining the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases*. *Cell Host & Microbe* [online]. 2008. 3 (6): 417–427 [cit. 11. 1. 2020]. DOI:10.1016/j.chom.2008.05.001.
- [94] HONDA K., TAKEDA K. *Regulatory mechanisms of immune responses to intestinal bacteria*. *Mucosal Immunology* [online]. 2009. 2 (3): 187–196 [cit. 11. 1. 2020]. DOI:10.1038/mi.2009.8.
- [95] PENDERS J., STOBBERINGH E. E., BRANDT P. A. Van den, THIJS C. *The role of the intestinal microbiota in the development of atopic disorders*. *Allergy* [online]. 2007. 62 (11): 1223–1236 [cit. 11. 1. 2020]. DOI:10.1111/j.1398-9995.2007.01462.x.

- [96] VERHULST S. L., VAEL C., BEUNCKENS C., NELEN V., GOOSSENS H., DESAGER K. A. *Longitudinal Analysis on the Association Between Antibiotic Use, Intestinal Microflora, and Wheezing During the First Year of Life*. *Journal of Asthma* [online]. 2008. 45 (9): 828–832 [cit. 11. 1. 2020]. DOI:10.1080/02770900802339734.
- [97] HOFER U., SPECK R. F. *Disturbance of the gut-associated lymphoid tissue is associated with disease progression in chronic HIV infection*. *Seminars in Immunopathology* [online]. 2009. 31 (2): 257–266 [cit. 11. 1. 2020]. DOI:10.1007/s00281-009-0158-3.
- [98] MAZMANIAN S. K., ROUND J. L., KASPER D. L. *A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease*. *Nature* [online]. 2008. 453 (7195): 620–625. DOI:10.1038/nature07008.
- [99] SMITH P. M., HOWITT M. R., PANIKOV N., MICHAUD M., GALLINI C. A., BOHLOOLY-Y M., GLICKMAN J. N., GARRETT W. S. *The Microbial Metabolites, Short-Chain Fatty Acids, Regulate Colonic Treg Cell Homeostasis*. *Science* [online]. 2013. 341 (6145): 569–573 [cit. 20. 1. 2020]. DOI:10.1126/science.1241165.
- [100] TANAKA S., KOBAYASHI T., SONGJINDA P., TATEYAMA A., TSUBOUCHI M., KIYOHARA C., SHIRAKAWA T., SONOMOTO K., NAKAYAMA J. *Influence of antibiotic exposure in the early postnatal period on the development of intestinal microbiota*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* [online]. 2009. 56 (1): 80–87 [cit. 11. 1. 2020]. DOI:10.1111/j.1574-695X.2009.00553.x.
- [101] DETHLEFSEN L., HUSE S., SOGIN M. L., RELMAN D. A. *The Pervasive Effects of an Antibiotic on the Human Gut Microbiota, as Revealed by Deep 16S rRNA Sequencing*. *PLoS Biology* [online]. 2008. 6 (11): 280 [cit. 11. 1. 2020]. DOI:10.1371/journal.pbio.0060280.
- [102] DE LA COCHETIÈRE M. F., DURAND T., LALANDE V., PETIT J. C., POTEL G., BEAUGERIE L. *Effect of Antibiotic Therapy on Human Fecal Microbiota and the Relation to the Development of Clostridium difficile*. *Microbial Ecology* [online]. 2008. 56 (3): 395–402 [cit. 11. 1. 2020]. DOI:10.1007/s00248-007-9356-5.
- [103] GOUDARZI M., SEYEDJAVADI S. S., GOUDARZI H., MEHDIZADEH AGHDAM E., NAZERI S. *Clostridium difficile Infection: Epidemiology, Pathogenesis, Risk Factors, and Therapeutic Options*. *Scientifica* [online]. 2014. 2014 : 1–9 [cit. 20. 1. 2020]. DOI:10.1155/2014/916826.
- [104] MCFARLAND L. V. *Antibiotic-associated diarrhea: epidemiology, trends and treatment*. *Future Microbiology* [online]. 2008. 3 (5): 563–578 [cit. 11. 1. 2020]. DOI:10.2217/17460913.3.5.563.
- [105] GRADEL K. O., DETHLEFSEN C., EJLERTSEN T., SCHØNHEYDER H. C., NIELSEN H. *Increased prescription rate of antibiotics prior to non-typhoid Salmonella infections: A one-year nested case-control study*. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* [online]. 2008. 40 (8): 635–641 [cit. 11. 1. 2020]. DOI:10.1080/00365540801961248.
- [106] IAPICHINO G., CALLEGARI M. L., MARZORATI S., CIGADA M., CORBELLA D., FERRARI S., MORELLI L. *Impact of antibiotics on the gut microbiota of critically ill patients*. *Journal of Medical Microbiology* [online]. 2008. 57 (8): 1007–1014 [cit. 11. 1. 2020]. DOI:10.1099/jmm.0.47387-0.
- [107] PACKEY C. D., SARTOR R. B. *Commensal bacteria, traditional and opportunistic pathogens, dysbiosis and bacterial killing in inflammatory bowel diseases*. *Current Opinion in Infectious Diseases* [online]. 2009. 22 (3): 292–301 [cit. 11. 1. 2020]. DOI:10.1097/QCO.0b013e32832a8a5d.
- [108] XAVIER R. J., PODOLSKY D. K. *Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease*. *Nature* [online]. 2007. 448 (7152): 427–434 [cit. 11. 1. 2020]. DOI:10.1038/nature06005.
- [109] WANG W., CHEN L., ZHOU R., WANG X., SONG L., HUANG S., WANG G., XIA B., FORBES B. A. *Increased Proportions of Bifidobacterium and the Lactobacillus Group and Loss of Butyrate-Producing Bacteria in Inflammatory Bowel Disease*. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2014. 52 (2): 398–406 [cit. 14. 1. 2020]. DOI:10.1128/JCM.01500-13.
- [110] MACHIELS K., JOOSSENS M., SABINO J., DE PRETER V., ARIJS I., EECKHAUT V., BALLEET V., CLAES K., VAN IMMERSEEL F., VERBEKE K., FERRANTE M., VERHAEGEN J., RUTGEERTS P., VERMEIRE S. *A decrease of the butyrate-producing species Roseburia hominis and Faecalibacterium prausnitzii defines dysbiosis in patients with*

- ulcerative colitis*. Gut [online]. 2014. 63 (8): 1275–1283 [cit. 14. 1. 2020]. DOI:10.1136/gutjnl-2013-304833.
- [111] WILLING B., HALFVARSON J., DICKSVED J., ROSENQUIST M., JÄRNEROT G., ENGSTRAND L., TYSK C., JANSSON J. K. *Twin studies reveal specific imbalances in the mucosa-associated microbiota of patients with ileal Crohn's disease*. Inflammatory Bowel Diseases [online]. 2009. 15 (5): 653–660 [cit. 11. 1. 2020]. DOI:10.1002/ibd.20783.
- [112] SOKOL H., PIGNEUR B., WATTERLOT L., LAKHDARI O., BERMUDEZ-HUMARAN L. G., GRATADOUX J.-J., BLUGEON S., BRIDONNEAU C., FURET J.-P., CORTHER G., GRANGETTE C., VASQUEZ N., POCHART P., TRUGNAN G., THOMAS G., BLOTTIERE H. M., DORE J., MARTEAU P., SEKSIK P., LANGELLA P. *Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients*. Proceedings of the National Academy of Sciences [online]. 2008. 105 (43): 16731–16736 [cit. 11. 1. 2020]. DOI:10.1073/pnas.0804812105.
- [113] GARRETT W. S., LORD G. M., PUNIT S., LUGO-VILLARINO G., MAZMANIAN S. K., ITO S., GLICKMAN J. N., GLIMCHER L. H. *Communicable Ulcerative Colitis Induced by T-bet Deficiency in the Innate Immune System*. Cell [online]. 2007. 131 (1): 33–45 [cit. 11. 1. 2020]. DOI:10.1016/j.cell.2007.08.017.
- [114] LOOIJER-VAN LANGEN M. A. C., DIELEMAN L. A. *Prebiotics in Chronic Intestinal Inflammation*. Inflammatory Bowel Diseases [online]. 2009. 15 (3): 454–462 [cit. 2. 1. 2020]. DOI:10.1002/ibd.20737.
- [115] SARTOR R. B. *Mechanisms of Disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis*. Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology [online]. 2006. 3 (7): 390–407. DOI:10.1038/ncpgasthep0528.
- [116] JAHANSHAHI G., MOTAVASEL V., REZAIE A., HASHTROUDI A. A., DARYANI N. E., ABDOLLAHI M. *Alterations in Antioxidant Power and Levels of Epidermal Growth Factor and Nitric Oxide in Saliva of Patients with Inflammatory Bowel Diseases*. Digestive Diseases and Sciences [online]. 2004. 49 (11–12): 1752–1757 [cit. 31. 1. 2020]. DOI:10.1007/s10620-004-9564-5.
- [117] LIH-BRODY L., POWELL S. R., COLLIER K. P., REDDY G. M., CERCHIA R., KAHN E., WEISSMAN G. S., KATZ S., FLOYD R. A., MCKINLEY M. J., FISHER S. E., MULLIN G. E. *Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease*. Digestive Diseases and Sciences [online]. 1996. 41 (10): 2078–2086 [cit. 31. 1. 2020]. DOI:10.1007/BF02093613.
- [118] PANES J. *Inflammatory bowel disease: pathogenesis and targets for therapeutic interventions*. Acta Physiologica Scandinavica [online]. 2001. 173 (1): 159–165 [cit. 8. 1. 2020]. DOI:10.1046/j.1365-201X.2001.00905.x.
- [119] LOFTUS E. V. *Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences*. Gastroenterology [online]. 2004. 126 (6): 1504–1517. DOI:10.1053/j.gastro.2004.01.063.
- [120] DIJKSTRA G., YUVARAJ S., JIANG H.-Q., BUN J. C. A. M., MOSHAGE H., KUSHNIR N., PEPPELENBOSCH M. P., CEBRA J. J., BOS N. A. *Early bacterial dependent induction of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in epithelial cells upon transfer of CD45RBhigh CD4+ T cells in a model for experimental colitis*. Inflammatory Bowel Diseases [online]. 2007. 13 (12): 1467–1474 [cit. 11. 1. 2020]. DOI:10.1002/ibd.20262.
- [121] STEPANKOVA R., POWRIE F., KOFRONOVA O., KOZAKOVA H., HUDCOVIC T., HRNCIR T., UHLIG H., READ S., REHAKOVA Z., BENADA O., HECZKO P., STRUS M., BLAND P., TLASKALOVA-HOGENOVA H. *Segmented filamentous bacteria in a defined bacterial cocktail induce intestinal inflammation in SCID mice reconstituted with CD45RBhigh CD4+ T cells*. Inflammatory Bowel Diseases [online]. 2007. 13 (10): 1202–1211 [cit. 11. 1. 2020]. DOI:10.1002/ibd.20221.
- [122] SHANAHAN F. *Inflammatory bowel disease: Immunodiagnostics, immunotherapeutics, and ecotherapeutics*. Gastroenterology [online]. 2001. 120 (3): 622–635. DOI:10.1053/gast.2001.22122.
- [123] RAZACK R., SEIDNER D. L. *Nutrition in inflammatory bowel disease*. Current Opinion in Gastroenterology [online]. 2007. 23 (4): 400–405 [cit. 22. 1. 2020].

- DOI:10.1097/MOG.0b013e3281ddb2a3.
- [124] KELLY D. G., FLEMING C. R. *Nutritional considerations in inflammatory bowel diseases*. Gastroenterology clinics of North America [online]. 1995. 24 (3): 597–611 [cit. 22. 1. 2020]. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8809238>>
- [125] FILIPPI J., AL-JAOUNI R., WIROTH J.-B., HÉBUTERNE X., SCHNEIDER S. M. *Nutritional deficiencies in patients with Crohn's disease in remission*. Inflammatory Bowel Diseases [online]. 2006. 12 (3): 185–191 [cit. 22. 1. 2020]. DOI:10.1097/01.MIB.0000206541.15963.c3.
- [126] BURROWES J. D. *Managing Crohn's Disease in Adults*. Nutrition Today [online]. 2008. 43 (4): 152–159. DOI:10.1097/01.NT.0000303342.60358.16.
- [127] SCHREZENMEIR J., DE VRESE M. *Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition*. The American Journal of Clinical Nutrition [online]. 2001. 73 (2): 361–364 [cit. 2. 1. 2020]. DOI:10.1093/ajcn/73.2.361s.
- [128] HILL C., GUARNER F., REID G., GIBSON G. R., MERENSTEIN D. J., POT B., MORELLI L., CANANI R. B., FLINT H. J., SALMINEN S., CALDER P. C., SANDERS M. E. *The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic*. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology [online]. 2014. 11 (8): 506–514 [cit. 8. 1. 2020]. DOI:10.1038/nrgastro.2014.66.
- [129] TOMASIK P. J., TOMASIK P. *Probiotics and Prebiotics*. Cereal Chemistry Journal [online]. 2003. 80 (2): 113–117 [cit. 2. 1. 2020]. DOI:10.1094/CCHEM.2003.80.2.113.
- [130] MATTILA-SANDHOLM T., MYLLÄRINEN P., CRITTENDEN R., MOGENSEN G., FONDÉN R., SAARELA M. *Technological challenges for future probiotic foods*. International Dairy Journal [online]. 2002. 12 (2–3): 173–182 [cit. 8. 1. 2020]. DOI:10.1016/S0958-6946(01)00099-1.
- [131] SALMINEN S. J., SAXELIN M. *Comparison of Successful Probiotic Strains*. Nutrition Today [online]. 1996. 31 (6): 32–34. Available at: <[https://journals.lww.com/nutritiontodayonline/Abstract/1996/11001/Comparison\\_of\\_Successful\\_Probiotic\\_Strains.10.aspx](https://journals.lww.com/nutritiontodayonline/Abstract/1996/11001/Comparison_of_Successful_Probiotic_Strains.10.aspx)>
- [132] *Vyhlaška č. 446/2004 Sb. ze dne 1.8. 2004, kterou se stanoví požadavky na doplňky stravy a na obohacování potravin potravními doplňky. Sbírka zákonů*
- [133] ALFALEH K., ANABREES J. *Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants*. Evidence-Based Child Health: A Cochrane Review Journal [online]. 2014. 9 (3): 584–671 [cit. 27. 11. 2019]. DOI:10.1002/ebch.1976.
- [134] FIOCCHI A., PAWANKAR R., CUELLO-GARCIA C., AHN K., AL-HAMMADI S., AGARWAL A., BEYER K., BURKS W., CANONICA G. W., EBISAWA M., GANDHI S., KAMENWA R., LEE B. W., LI H., PRESCOTT S., RIVA J. J., ROSENWASSER L., SAMPSON H., SPIGLER M., TERRACCIANO L., VEREDA-ORTIZ A., WASERMAN S., YEPES-NUÑEZ J. J., BROŽEK J. L., SCHÜNEMANN H. J. *World Allergy Organization-McMaster University Guidelines for Allergic Disease Prevention (GLAD-P): Probiotics*. World Allergy Organization Journal [online]. 2015. 8 (1): 4 [cit. 8. 1. 2020]. DOI:10.1186/s40413-015-0055-2.
- [135] SANDERS M. E. *Probiotics: Considerations for Human Health*. Nutrition Reviews [online]. 2003. 61 (3): 91–99 [cit. 19. 11. 2019]. DOI:10.1301/nr.2003.marr.91-99.
- [136] FORSYTHE P., INMAN M. D., BIENENSTOCK J. *Oral Treatment with Live Lactobacillus reuteri Inhibits the Allergic Airway Response in Mice*. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine [online]. 2007. 175 (6): 561–569 [cit. 11. 1. 2020]. DOI:10.1164/rccm.200606-821OC.
- [137] FELESZKO W., JAWORSKA J., RHA R.-D., STEINHAUSEN S., AVAGYAN A., JAUDSZUS A., AHRENS B., GRONEBERG D. A., WAHN U., HAMELMANN E. *Probiotic-induced suppression of allergic sensitization and airway inflammation is associated with an increase of T regulatory-dependent mechanisms in a murine model of asthma*. Clinical & Experimental Allergy [online]. 2007. 37 (4): 498–505 [cit. 11. 1. 2020]. DOI:10.1111/j.1365-2222.2006.02629.x.
- [138] ISOLAURI E., RAUTAVA S., KALIOMÄKKI M., KIRJAVAINEN P., SALMINEN S. *Role of probiotics in food hypersensitivity*. Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology [online]. 2002. 2 : 263–271 [cit. 20. 1. 2020]. Available at: <<https://journals.lww.com/co>

- allergy/Abstract/2002/06000/Role\_of\_probiotics\_in\_food\_hypersensitivity.18.aspx>
- [139] KALLIOMÄKI M., SALMINEN S., ARVILOMMI H., KERO P., KOSKINEN P., ISOLAURI E. *Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial*. The Lancet [online]. 2001. 357 (9262): 1076–1079 [cit. 20. 1. 2020]. DOI:10.1016/S0140-6736(00)04259-8.
- [140] MALIN M., VERRONEN P., MYKKÄNEN H., SALMINEN S., ISOLAURI E. *INCREASED BACTERIAL UREASE ACTIVITY IN FAECES IN JUVENILE CHRONIC ARTHRITIS: EVIDENCE OF ALTERED INTESTINAL MICROFLORA?*. Rheumatology [online]. 1996. 35 (7): 689–694 [cit. 20. 1. 2020]. DOI:10.1093/rheumatology/35.7.689.
- [141] MATRICARDI P. M. *Probiotics against allergy: data, doubts, and perspectives*. Allergy [online]. 2002. 57 (3): 185–187 [cit. 20. 1. 2020]. DOI:10.1034/j.1398-9995.2002.1a3299.x.
- [142] NANJI A. A., KHETTRY U., SADRZADEH S. M. H. *Lactobacillus Feeding Reduces Endotoxemia and Severity of Experimental Alcoholic Liver (Disease)*. Experimental Biology and Medicine [online]. 1994. 205 (3): 243–247 [cit. 20. 1. 2020]. DOI:10.3181/00379727-205-43703.
- [143] FELLE C. P., CORTHÉSY-THEULAZ I., RIVERO J.-L. B., SIPPONEN P., KAUFMANN M., BAERFEIND P., WIESEL P. H., BRASSART D., PFEIFER A. *Favourable effect of an acidified milk (LC-1) on Helicobacter pylorigastritis in man*. European Journal of Gastroenterology & Hepatology [online]. 2001. 13 (1): 25–29 [cit. 20. 1. 2020]. Available at: <[https://journals.lww.com/eurojgh/Abstract/2001/01000/Favourable\\_effect\\_of\\_an\\_acidified\\_milk\\_LC\\_1\\_on.5.aspx](https://journals.lww.com/eurojgh/Abstract/2001/01000/Favourable_effect_of_an_acidified_milk_LC_1_on.5.aspx)>
- [144] MARTEAU P., SEKSIK P., JIAN R. *Probiotics and intestinal health effects: a clinical perspective*. British Journal of Nutrition [online]. 2002. 88 (S1): s51–s57 [cit. 20. 1. 2020]. DOI:10.1079/BJN2002629.
- [145] JOHNSTON B. C., GOLDENBERG J. Z., PARKIN P. C. *Probiotics and the Prevention of Antibiotic-Associated Diarrhea in Infants and Children*. JAMA [online]. 2016. 316 (14): 1484 [cit. 8. 1. 2020]. DOI:10.1001/jama.2016.11838.
- [146] HATA Y., YAMAMOTO M., OHNI M., NAKAJIMA K., NAKAMURA Y., TAKANO T. *A placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects*. The American Journal of Clinical Nutrition [online]. 1996. 64 (5): 767–771 [cit. 20. 1. 2020]. DOI:10.1093/ajcn/64.5.767.
- [147] SHANAHAN F. *Probiotics and inflammatory bowel disease: from fads and fantasy to facts and future*. British Journal of Nutrition [online]. 2002. 88 (S1): s5–s9 [cit. 20. 1. 2020]. DOI:10.1079/BJN2002624.
- [148] SCHULTZ M., TIMMER A., HERFARTH H. H., SARTOR R. B., VANDERHOOF J. A., RATH H. C. *Lactobacillus GG in inducing and maintaining remission of Crohn's disease*. BMC Gastroenterology [online]. 2004. 4 (1): 5 [cit. 12. 1. 2020]. DOI:10.1186/1471-230X-4-5.
- [149] GUSLANDI M. *Probiotics for Crohn's disease: Are they all alike?*. Inflammatory Bowel Diseases [online]. 2007. 13 (10): 1314 [cit. 2. 1. 2020]. DOI:10.1002/ibd.20159.
- [150] FEDORAK R. N., MADSEN K. L. *Probiotics and the Management of Inflammatory Bowel Disease*. Inflammatory Bowel Diseases [online]. 2004. 10 (3): 286–299 [cit. 2. 1. 2020]. DOI:10.1097/00054725-200405000-00018.
- [151] MADDEN J. A. J., HUNTER J. O. *A review of the role of the gut microflora in irritable bowel syndrome and the effects of probiotics*. British Journal of Nutrition [online]. 2002. 88 (S1): s67–s72 [cit. 20. 1. 2020]. DOI:10.1079/BJN2002631.
- [152] ISOLAURI E., SÜTAS Y., KANKAANPÄÄ P., ARVILOMMI H., SALMINEN S. *Probiotics: effects on immunity*. The American Journal of Clinical Nutrition [online]. 2001. 73 (2): 444s-450s [cit. 20. 1. 2020]. DOI:10.1093/ajcn/73.2.444s.
- [153] FREI R., AKDIS M., O'MAHONY L. *Prebiotics, probiotics, synbiotics, and the immune system*. Current Opinion in Gastroenterology [online]. 2015. 31 (2): 153–158 [cit. 8. 1. 2020]. DOI:10.1097/MOG.000000000000151.
- [154] WOLLOWSKI I., RECHKEMMER G., POOL-ZOBEL B. L. *Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer*. The American Journal of Clinical Nutrition [online]. 2001. 73 (2): 451s-455s [cit. 20. 1. 2020]. DOI:10.1093/ajcn/73.2.451s.
- [155] RAFTER J. *Lactic acid bacteria and cancer: mechanistic perspective*. British Journal of

- Nutrition [online]. 2002. 88 (S1): S89–S94 [cit. 20. 1. 2020]. DOI:10.1079/BJN2002633.
- [156] MENDES M. C. S., PAULINO D. S. M., BRAMBILLA S. R., CAMARGO J. A., PERSINOTI G. F., CARVALHEIRA J. B. C. *Microbiota modification by probiotic supplementation reduces colitis associated colon cancer in mice*. World Journal of Gastroenterology [online]. 2018. 24 (18): 1995–2008 [cit. 8. 1. 2020]. DOI:10.3748/wjg.v24.i18.1995.
- [157] DE VRESE M., STEGELMANN A., RICHTER B., FENSELAU S., LAUE C., SCHREZENMEIR J. *Probiotics—compensation for lactase insufficiency*. The American Journal of Clinical Nutrition [online]. 2001. 73 (2): 421s-429s [cit. 20. 1. 2020]. DOI:10.1093/ajcn/73.2.421s.
- [158] OAK S. J., JHA R. *The effects of probiotics in lactose intolerance: A systematic review*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition [online]. 2019. 59 (11): 1675–1683 [cit. 8. 1. 2020]. DOI:10.1080/10408398.2018.1425977.
- [159] CAMPIERI C., CAMPIERI M., BERTUZZI V., SWENNEN E., MATTEUZZI D., STEFONI S., PIROVANO F., CENTI C., ULISSE S., FAMULARO G., DE SIMONE C. *Reduction of oxaluria after an oral course of lactic acid bacteria at high concentration*. Kidney International [online]. 2001. 60 (3): 1097–1105 [cit. 20. 1. 2020]. DOI:10.1046/j.1523-1755.2001.0600031097.x.
- [160] DUNN S. R., SIMENHOFF M. L., AHMED K. E., GAUGHAN W. J., ELTAYEB B. O., FITZPATRICK M.-E. D., EMERY S. M., AYRES J. W., HOLT K. E. *Effect of Oral Administration of Freeze-Dried Lactobacillus acidophilus on Small Bowel Bacterial Overgrowth in Patients with End Stage Kidney Disease: Reducing Uremic Toxins and Improving Nutrition*. International Dairy Journal [online]. 1998. 8 (5–6): 545–553 [cit. 20. 1. 2020]. DOI:10.1016/S0958-6946(98)00081-8.
- [161] NÄSE L., HATAKKA K., SAVILAHTI E., SAXELIN M., PÖNKÄ A., POUSSA T., KORPELA R., MEURMAN J. H. *Effect of Long-Term Consumption of a Probiotic Bacterium, Lactobacillus rhamnosus GG, in Milk on Dental Caries and Caries Risk in Children*. Caries Research [online]. 2001. 35 (6): 412–420 [cit. 20. 1. 2020]. DOI:10.1159/000047484.
- [162] REID G. *Probiotics for Urogenital Health*. Nutrition in Clinical Care [online]. 2002. 5 (1): 3–8 [cit. 20. 1. 2020]. DOI:10.1046/j.1523-5408.2002.00512.x.
- [163] DE ROOS N. M., KATAN M. B. *Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998*. The American Journal of Clinical Nutrition [online]. 2000. 71 (2): 405–411 [cit. 20. 1. 2020]. DOI:10.1093/ajcn/71.2.405.
- [164] ALAKOMI H.-L., SKYTТА E., SAARELA M., MATTILA-SANDHOLM T., LATVA-KALA K., HELANDER I. M. *Lactic Acid Permeabilizes Gram-Negative Bacteria by Disrupting the Outer Membrane*. Applied and Environmental Microbiology [online]. 2000. 66 (5): 2001–2005 [cit. 11. 1. 2020]. DOI:10.1128/AEM.66.5.2001-2005.2000.
- [165] DOBSON A., COTTER P. D., PAUL ROSS R., HILL C. *Bacteriocin production: A probiotic trait?* [online]. január 2012. DOI:10.1128/AEM.05576-11.
- [166] SASSONE-CORSI M., RAFFATELLU M. *No Vacancy: How Beneficial Microbes Cooperate with Immunity To Provide Colonization Resistance to Pathogens*. The Journal of Immunology [online]. 2015. 194 (9): 4081–4087 [cit. 8. 1. 2020]. DOI:10.4049/jimmunol.1403169.
- [167] SANZ Y., NADAL I., SANCHEZ E. *Probiotics as Drugs Against Human Gastrointestinal Infections*. Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery [online]. 2007. 2 (2): 148–156 [cit. 11. 1. 2020]. DOI:10.2174/157489107780832596.
- [168] WOO J., AHN J. *Probiotic-mediated competition, exclusion and displacement in biofilm formation by food-borne pathogens*. Letters in Applied Microbiology [online]. 2013. 56 (4): 307–313 [cit. 9. 1. 2020]. DOI:10.1111/lam.12051.
- [169] CHAPMAN C. M. C., GIBSON G. R., ROWLAND I. *Effects of single- and multi-strain probiotics on biofilm formation and in vitro adhesion to bladder cells by urinary tract pathogens*. Anaerobe [online]. 2014. 27 : 71–76 [cit. 9. 1. 2020]. DOI:10.1016/j.anaerobe.2014.02.001.
- [170] JAMES K. M., MACDONALD K. W., CHANYI R. M., CADIEUX P. A., BURTON J. P. *Inhibition of Candida albicans biofilm formation and modulation of gene expression by probiotic cells and supernatant*. Journal of Medical Microbiology [online]. 2016. 65 (4): 328–336 [cit. 9. 1. 2020]. DOI:10.1099/jmm.0.000226.

- [171] WU C.-C., LIN C.-T., WU C.-Y., PENG W.-S., LEE M.-J., TSAI Y.-C. *Inhibitory effect of Lactobacillus salivarius on Streptococcus mutans biofilm formation*. Molecular Oral Microbiology [online]. 2015. 30 (1): 16–26 [cit. 9. 1. 2020]. DOI:10.1111/omi.12063.
- [172] AGAZZI A. *The Beneficial Role of Probiotics in Monogastric Animal Nutrition and Health*. Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research [online]. 2015. 2 (4) [cit. 8. 1. 2020]. DOI:10.15406/jdvar.2015.02.00041.
- [173] PAGNINI C., SAEED R., BAMIAS G., ARSENEAU K. O., PIZARRO T. T., COMINELLI F. *Probiotics promote gut health through stimulation of epithelial innate immunity*. Proceedings of the National Academy of Sciences [online]. 2010. 107 (1): 454–459 [cit. 9. 1. 2020]. DOI:10.1073/pnas.0910307107.
- [174] FULLER R. *Probiotics: The scientific basis*. 2012. B.m., Springer Science & Business Media.
- [175] CHEN X., KOKKOTOU E. G., MUSTAFA N., BHASKAR K. R., SOUGIOULTZIS S., O'BRIEN M., POTHOUKAKIS C., KELLY C. P. *Saccharomyces boulardii Inhibits ERK1/2 Mitogen-activated Protein Kinase Activation Both in Vitro and in Vivo and Protects against Clostridium difficile Toxin A-induced Enteritis*. Journal of Biological Chemistry [online]. 2006. 281 (34): 24449–24454 [cit. 8. 1. 2020]. DOI:10.1074/jbc.M605200200.
- [176] RIPERT G., RACEDO S. M., ELIE A.-M., JACQUOT C., BRESSOLLIER P., URDACI M. C. *Secreted Compounds of the Probiotic Bacillus clausii Strain O/C Inhibit the Cytotoxic Effects Induced by Clostridium difficile and Bacillus cereus Toxins*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy [online]. 2016. 60 (6): 3445–3454 [cit. 8. 1. 2020]. DOI:10.1128/AAC.02815-15.
- [177] LEE D. K., PARK J. E., KIM M. J., SEO J. G., LEE J. H., HAN J. *Probiotic bacteria, B. longum and L. acidophilus inhibit infection by rotavirus in vitro and decrease the duration of diarrhea in pediatric patients*. Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology [online]. 2015. 39 (2): 237–244 [cit. 9. 1. 2020]. DOI:10.1016/j.clinre.2014.09.006.
- [178] DI GIACINTO C., MARINARO M., SANCHEZ M., STROBER W., BOIRIVANT M. *Probiotics Ameliorate Recurrent Th1-Mediated Murine Colitis by Inducing IL-10 and IL-10-Dependent TGF- $\beta$ -Bearing Regulatory Cells*. The Journal of Immunology [online]. 2005. 174 (6): 3237–3246 [cit. 12. 1. 2020]. DOI:10.4049/jimmunol.174.6.3237.
- [179] PENA J. A., VERSALOVIC J. *Lactobacillus rhamnosus GG decreases TNF-alpha production in lipopolysaccharide-activated murine macrophages by a contact-independent mechanism*. Cellular Microbiology [online]. 2003. 5 (4): 277–285 [cit. 12. 1. 2020]. DOI:10.1046/j.1462-5822.2003.t01-1-00275.x.
- [180] KIM S. O., SHEIKH H. I., HA S.-D., MARTINS A., REID G. *G-CSF-mediated inhibition of JNK is a key mechanism for Lactobacillus rhamnosus-induced suppression of TNF production in macrophages*. Cellular Microbiology [online]. 2006. 8 (12): 1958–1971 [cit. 12. 1. 2020]. DOI:10.1111/j.1462-5822.2006.00763.x.
- [181] MATSUMOTO S., HARA T., HORI T., MITSUYAMA K., NAGAOKA M., TOMIYASU N., SUZUKI A., SATA M. *Probiotic Lactobacillus-induced improvement in murine chronic inflammatory bowel disease is associated with the down-regulation of pro-inflammatory cytokines in lamina propria mononuclear cells*. Clinical and Experimental Immunology [online]. 2005. 140 (3): 417–426 [cit. 12. 1. 2020]. DOI:10.1111/j.1365-2249.2005.02790.x.
- [182] STURM A., RILLING K., BAUMGART D. C., GARGAS K., ABOU-GHAZALE T., RAUPACH B., ECKERT J., SCHUMANN R. R., ENDERS C., SONNENBORN U., WIEDENMANN B., DIGNASS A. U. *Escherichia coli Nissle 1917 Distinctively Modulates T-Cell Cycling and Expansion via Toll-Like Receptor 2 Signaling*. Infection and Immunity [online]. 2005. 73 (3): 1452–1465 [cit. 12. 1. 2020]. DOI:10.1128/IAI.73.3.1452-1465.2005.
- [183] NG S. C., HART A. L., KAMM M. A., STAGG A. J., KNIGHT S. C. *Mechanisms of action of probiotics: Recent advances*. Inflammatory Bowel Diseases [online]. 2009. 15 (2): 300–310 [cit. 2. 1. 2020]. DOI:10.1002/ibd.20602.
- [184] ZYREK A. A., CICHON C., HELMS S., ENDERS C., SONNENBORN U., SCHMIDT M. A. *Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of Escherichia coli Nissle 1917 involve ZO-2 and PKC $\zeta$  redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair*. Cellular Microbiology [online]. 2007. 9 (3): 804–816 [cit. 12. 1. 2020]. DOI:10.1111/j.1462-5822.2006.00836.x.
- [185] OTTE J.-M., PODOLSKY D. K. *Functional modulation of enterocytes by gram-positive and*

- gram-negative microorganisms*. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology [online]. 2004. 286 (4): 613–626 [cit. 12. 1. 2020]. DOI:10.1152/ajpgi.00341.2003.
- [186] SCHLEE M., HARDER J., KÖTEN B., STANGE E. F., WEHKAMP J., FELLERMANN K. *Probiotic lactobacilli and VSL#3 induce enterocyte  $\beta$ -defensin 2*. Clinical & Experimental Immunology [online]. 2008. 151 (3): 528–535 [cit. 12. 1. 2020]. DOI:10.1111/j.1365-2249.2007.03587.x.
- [187] WEHKAMP J., HARDER J., WEHKAMP K., MEISSNER B. W. -v., SCHLEE M., ENDERS C., SONNENBORN U., NUDING S., BENGMARK S., FELLERMANN K., SCHRODER J. M., STANGE E. F. *NF- $\kappa$ B- and AP-1-Mediated Induction of Human Beta Defensin-2 in Intestinal Epithelial Cells by Escherichia coli Nissle 1917: a Novel Effect of a Probiotic Bacterium*. Infection and Immunity [online]. 2004. 72 (10): 5750–5758 [cit. 12. 1. 2020]. DOI:10.1128/IAI.72.10.5750-5758.2004.
- [188] SETH A., YAN F., POLK D. B., RAO R. K. *Probiotics ameliorate the hydrogen peroxide-induced epithelial barrier disruption by a PKC- and MAP kinase-dependent mechanism*. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology [online]. 2008. 294 (4): 1060–1069 [cit. 12. 1. 2020]. DOI:10.1152/ajpgi.00202.2007.
- [189] YAN F., POLK D. B. *Probiotic Bacterium Prevents Cytokine-induced Apoptosis in Intestinal Epithelial Cells*. Journal of Biological Chemistry [online]. 2002. 277 (52): 50959–50965 [cit. 12. 1. 2020]. DOI:10.1074/jbc.M207050200.
- [190] TAO Y., DRABIK K. A., WAYPA T. S., MUSCH M. W., ALVERDY J. C., SCHNEEWIND O., CHANG E. B., PETROF E. O. *Soluble factors from Lactobacillus GG activate MAPKs and induce cytoprotective heat shock proteins in intestinal epithelial cells*. American Journal of Physiology-Cell Physiology [online]. 2006. 290 (4): 1018–1030 [cit. 12. 1. 2020]. DOI:10.1152/ajpcell.00131.2005.
- [191] OTT S. J. *Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease*. Gut [online]. 2004. 53 (5): 685–693 [cit. 12. 1. 2020]. DOI:10.1136/gut.2003.025403.
- [192] MYLONAKI M., RAYMENT N. B., RAMPTON D. S., HUDSPITH B. N., BROSTOFF J. *Molecular Characterization of Rectal Mucosa-Associated Bacterial Flora in Inflammatory Bowel Disease*. Inflammatory Bowel Diseases [online]. 2005. 11 (5): 481–487 [cit. 12. 1. 2020]. DOI:10.1097/01.MIB.0000159663.62651.4f.
- [193] CONTE M. P., SCHIPPA S., ZAMBONI I., PENTA M., CHIARINI F., SEGANTI L., OSBORN J., FALCONIERI P., BORRELLI O., CUCCHIARA S. *Gut-associated bacterial microbiota in paediatric patients with inflammatory bowel disease*. Gut [online]. 2006. 55 (12): 1760–1767 [cit. 12. 1. 2020]. DOI:10.1136/gut.2005.078824.
- [194] ISAACS K., HERFARTH H. *Role of probiotic therapy in IBD*. Inflammatory Bowel Diseases [online]. 2008. 14 (11): 1597–1605 [cit. 12. 1. 2020]. DOI:10.1002/ibd.20465.
- [195] MESSAOUDI M., LALONDE R., VIOLLE N., JAVELOT H., DESOR D., NEJDI A., BISSON J.-F., ROUGEOT C., PICHELIN M., CAZAUBIEL M., CAZAUBIEL J.-M. *Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation ( Lactobacillus helveticus R0052 and Bifidobacterium longum R0175) in rats and human subjects*. British Journal of Nutrition [online]. 2011. 105 (5): 755–764 [cit. 6. 1. 2020]. DOI:10.1017/S0007114510004319.
- [196] FICHNA J., STORR M. A. *Brain-Gut Interactions in IBS*. Frontiers in Pharmacology [online]. 2012. 3 [cit. 15. 1. 2020]. DOI:10.3389/fphar.2012.00127.
- [197] RAO A. V., BESTED A. C., BEAULNE T. M., KATZMAN M. A., IORIO C., BERARDI J. M., LOGAN A. C. *A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study of a probiotic in emotional symptoms of chronic fatigue syndrome*. Gut Pathogens [online]. 2009. 1 (1): 6 [cit. 4. 1. 2020]. DOI:10.1186/1757-4749-1-6.
- [198] O'MAHONY L., MCCARTHY J., KELLY P., HURLEY G., LUO F., CHEN K., O'SULLIVAN G. C., KIELY B., COLLINS J. K., SHANAHAN F., QUIGLEY E. M. M. *Lactobacillus and bifidobacterium in irritable bowel syndrome: Symptom responses and relationship to cytokine profiles*. Gastroenterology [online]. 2005. 128 (3): 541–551 [cit. 4. 1. 2020]. DOI:10.1053/j.gastro.2004.11.050.
- [199] DESBONNET L., GARRETT L., CLARKE G., BIENENSTOCK J., DINAN T. G. *The probiotic Bifidobacteria infantis: An assessment of potential antidepressant properties in the rat*. Journal



- of Psychiatric Research [online]. 2008. 43 (2): 164–174 [cit. 15. 1. 2020]. DOI:10.1016/j.jpsychires.2008.03.009.
- [200] DORON S., SNYDMAN D. R. *Risk and Safety of Probiotics*. Clinical Infectious Diseases [online]. 2015. 60 (suppl\_2): S129–S134 [cit. 10. 1. 2020]. DOI:10.1093/cid/civ085.
- [201] RAYES N., SEEHOFER D., THERUVATH T., SCHILLER R. A., LANGREHR J. M., JONAS S., BENGMARK S., NEUHAUS P. *Supply of Pre- and Probiotics Reduces Bacterial Infection Rates After Liver Transplantation-A Randomized, Double-Blind Trial*. American Journal of Transplantation [online]. 2005. 5 (1): 125–130 [cit. 10. 1. 2020]. DOI:10.1111/j.1600-6143.2004.00649.x.
- [202] RAYES N., SEEHOFER D., HANSEN S., BOUCSEIN K., MILLER A. R., SERKE S., BENGMARK S., NEUHAUS P. *Early enteral supply of lactobacillus and fiber versus selective bowel decontamination: a controlled trial in liver transplant recipients*. Transplantation [online]. 2002. 74 (1): 123–128. DOI:10.1097/00007890-200207150-00021.
- [203] WEIZMAN Z., ASLI G., ALSHEIKH A. *Effect of a Probiotic Infant Formula on Infections in Child Care Centers: Comparison of Two Probiotic Agents*. Pediatrics [online]. 2005. 115 (1): 5–9 [cit. 10. 1. 2020]. DOI:10.1542/peds.2004-1815.
- [204] DAY A. S., ABBOTT G. D. *D-lactic acidosis in short bowel syndrome*. New Zealand Medical Journal. 1999. 112 (1092): 277–278.
- [205] AGUIRRE M., COLLINS M. D. *Lactic acid bacteria and human clinical infection*. Journal of Applied Bacteriology [online]. 1993. 75 (2): 95–107 [cit. 20. 1. 2020]. DOI:10.1111/j.1365-2672.1993.tb02753.x.
- [206] HAMILTON-MILLER J., SHAH S., WINKLER J. *Public health issues arising from microbiological and labelling quality of foods and supplements containing probiotic microorganisms*. Public Health Nutrition [online]. 1999. 2 (2): 223–229. DOI:10.1017/s1368980099000282.
- [207] PRISCIANDARO L., GEIER M., BUTLER R., CUMMINS A., HOWARTH G. *Probiotics and their derivatives as treatments for inflammatory bowel disease*. Inflammatory Bowel Diseases [online]. 2009. 15 (12): 1906–1914 [cit. 2. 1. 2020]. DOI:10.1002/ibd.20938.
- [208] HOLZAPFEL W. H., SCHILLINGER U. *Introduction to pre- and probiotics*. V: Food Research International [online]. 2002, 109–116. DOI:10.1016/S0963-9969(01)00171-5.
- [209] GIBSON G. R., HUTKINS R., SANDERS M. E., PRESCOTT S. L., REIMER R. A., SALMINEN S. J., SCOTT K., STANTON C., SWANSON K. S., CANI P. D., VERBEKE K., REID G. *Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics*. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology [online]. 2017. 14 (8): 491–502 [cit. 2. 1. 2020]. DOI:10.1038/nrgastro.2017.75.
- [210] HAMMES W. P., VOGEL R. F. *The genus Lactobacillus*. V: The Genera of Lactic Acid Bacteria [online]. 1995. Boston, MA, Springer US, [cit. 24. 1. 2020], 19–54. DOI:10.1007/978-1-4615-5817-0\_3.
- [211] NĚMEC M., MATOULKOVÁ D. *Základy obecné mikrobiologie*. 2015. Brno, Masarykova univerzita.
- [212] LLOPIS M., ANTOLIN M., CAROL M., BORRUEL N., CASELLAS F., MARTINEZ C., ESPÍN-BASANY E., GUARNER F., MALAGELADA J. R. *Lactobacillus casei downregulates commensals' inflammatory signals in Crohn's disease mucosa*. Inflammatory Bowel Diseases [online]. 2009. 15 (2): 275–283 [cit. 2. 1. 2020]. DOI:10.1002/ibd.20736.
- [213] SGORBATI B., BIAVATI B., PALENZONA D. *The genus Bifidobacterium*. V: The Genera of Lactic Acid Bacteria [online]. 1995. B.m., Springer US, 279–306. DOI:10.1007/978-1-4615-5817-0\_8.
- [214] TABBERS M. M., DE MILLIANO I., ROSEBOOM M. G., BENNINGA M. A. *Is Bifidobacterium breve effective in the treatment of childhood constipation? Results from a pilot study*. Nutrition Journal [online]. 2011. 10 (1): 19. DOI:10.1186/1475-2891-10-19.
- [215] SAGAR S., MORGAN M. E., CHEN S., VOS A. P., GARSSSEN J., VAN BERGENHENEGOUWEN J., BOON L., GEORGIU N. A., KRANEVELD A. D., FOLKERTS G. *Bifidobacterium breve and Lactobacillus rhamnosus treatment is as effective as budesonide at reducing inflammation in a murine model for chronic asthma*. Respiratory

- Research [online]. 2014. 15 (1): 46. DOI:10.1186/1465-9921-15-46.
- [216] ROBERFROID M. *Prebiotics: The Concept Revisited*. The Journal of Nutrition [online]. 2007. 137 (3): 830S-837S. DOI:10.1093/jn/137.3.830S.
- [217] MANNING T. S., GIBSON G. R. *Prebiotics*. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology [online]. 2004. 18 (2): 287–298. DOI:10.1016/j.bpg.2003.10.008.
- [218] LINDSAY J. O. *Clinical, microbiological, and immunological effects of fructo-oligosaccharide in patients with Crohn's disease*. Gut [online]. 2006. 55 (3): 348–355. DOI:10.1136/gut.2005.074971.
- [219] ROBERFROID M. B. *Inulin-Type Fructans: Functional Food Ingredients*. The Journal of Nutrition [online]. 2007. 137 (11): 2493S-2502S. DOI:10.1093/jn/137.11.2493S.
- [220] BENGMARK S. *Bioecologic Control of the Gastrointestinal Tract: The Role of Flora and Supplemented Probiotics and Synbiotics*. Gastroenterology Clinics of North America [online]. 2005. 34 (3): 413–436 [cit. 15. 1. 2020]. DOI:10.1016/j.gtc.2005.05.002.
- [221] BENGMARK S., MARTINDALE R. *Prebiotics and Synbiotics in Clinical Medicine*. Nutrition in Clinical Practice [online]. 2005. 20 (2): 244–261 [cit. 15. 1. 2020]. DOI:10.1177/0115426505020002244.
- [222] MALAGUARNERA G. *Gut microbiota in alcoholic liver disease: Pathogenetic role and therapeutic perspectives*. World Journal of Gastroenterology [online]. 2014. 20 (44): 16639 [cit. 15. 1. 2020]. DOI:10.3748/wjg.v20.i44.16639.
- [223] BOMBA A., NEMCOVÁ R., GANCARCÍKOVÁ S., HERICH R., GUBA P., MUDRONOVÁ D. *Improvement of the probiotic effect of micro-organisms by their combination with maltodextrins, fructo-oligosaccharides and polyunsaturated fatty acids*. British Journal of Nutrition [online]. 2002. 88 (S1): S95–S99 [cit. 15. 1. 2020]. DOI:10.1079/BJN2002634.
- [224] FALAGAS M. E., KOMPOTI M. *Obesity and infection* [online]. júl 2006. DOI:10.1016/S1473-3099(06)70523-0.
- [225] WATZL B. *Anti-inflammatory Effects of Plant-based Foods and of their Constituents*. International Journal for Vitamin and Nutrition Research [online]. 2008. 78 (6): 293–298. DOI:10.1024/0300-9831.78.6.293.
- [226] FIELD C. J., JOHNSON I. R., SCHLEY P. D. *Nutrients and their role in host resistance to infection*. Journal of leukocyte biology [online]. 2002. 71 (1): 16–32 [cit. 6. 1. 2020]. DOI:10.1189/jlb.71.1.16.
- [227] RATHEE P., CHAUDHARY H., RATHEE S., RATHEE D., KUMAR V., KOHLI K. *Mechanism of Action of Flavonoids as Anti-inflammatory Agents: A Review*. Inflammation & Allergy - Drug Targets [online]. 2009. 8 (3): 229–235 [cit. 28. 1. 2020]. DOI:10.2174/187152809788681029.
- [228] MUELLER M., HOBIGER S., JUNGBAUER A. *Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices*. Food Chemistry [online]. 2010. 122 (4): 987–996 [cit. 28. 1. 2020]. DOI:10.1016/j.foodchem.2010.03.041.
- [229] GARCÍA-LAFUENTE A., GUILLAMÓN E., VILLARES A., ROSTAGNO M. A., MARTÍNEZ J. A. *Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease*. Inflammation Research [online]. 2009. 58 (9): 537–552 [cit. 28. 1. 2020]. DOI:10.1007/s00011-009-0037-3.
- [230] ZHU F., DU B., XU B. *Anti-inflammatory effects of phytochemicals from fruits, vegetables, and food legumes: A review*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition [online]. 2018. 58 (8): 1260–1270. DOI:10.1080/10408398.2016.1251390.
- [231] SIES H. *Oxidative stress: oxidants and antioxidants*. Experimental Physiology [online]. 1997. 82 (2): 291–295 [cit. 5. 12. 2019]. DOI:10.1113/expphysiol.1997.sp004024.
- [232] SITI H. N., KAMISAH Y., KAMSIJAH J. *The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review)*. Vascular Pharmacology [online]. 2015. 71 : 40–56 [cit. 5. 12. 2019]. DOI:10.1016/j.vph.2015.03.005.
- [233] CATALDI A. *Cell Responses to Oxidative Stressors*. Current Pharmaceutical Design [online]. 2010. 16 (12): 1387–1395 [cit. 5. 12. 2019]. DOI:10.2174/138161210791033969.
- [234] EMERIT J., EDEAS M., BRICAIRE F. *Neurodegenerative diseases and oxidative stress*. Biomedicine & Pharmacotherapy [online]. 2004. 58 (1): 39–46 [cit. 5. 12. 2019]. DOI:10.1016/j.biopha.2003.11.004.

- [235] MOHAMED S. *Functional foods against metabolic syndrome (obesity, diabetes, hypertension and dyslipidemia) and cardiovascular disease*. Trends in Food Science & Technology [online]. 2014. 35 (2): 114–128 [cit. 5. 12. 2019]. DOI:10.1016/j.tifs.2013.11.001.
- [236] VALKO M., LEIBFRITZ D., MONCOL J., CRONIN M. T. D., MAZUR M., TELSER J. *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology [online]. 2007. 39 (1): 44–84 [cit. 5. 12. 2019]. DOI:10.1016/j.biocel.2006.07.001.
- [237] ODENDAAL A. Y., SCHAUSS A. G. *Potent Antioxidant and Anti-Inflammatory Flavonoids in the Nutrient-Rich Amazonian Palm Fruit, Açai (Euterpe spp.)*. V: Polyphenols in Human Health and Disease [online]. 2014. B.m., Elsevier, [cit. 5. 12. 2019], 219–239. DOI:10.1016/B978-0-12-398456-2.00018-9.
- [238] BUCHNAN B. B., GRUISSEM W., RUSSELL L. J. *Biochemistry*. 2000. Rockville, American Society of Plant Physiologists.
- [239] KRIS-ETHERTON P. M., HECKER K. D., BONANOME A., COVAL S. M., BINKOSKI A. E., HILPERT K. F., GRIEL A. E., ETHERTON T. D. *Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer*. The American Journal of Medicine [online]. 2002. 113 (9): 71–88 [cit. 29. 1. 2020]. DOI:10.1016/S0002-9343(01)00995-0.
- [240] CALDER P. C. *n-3 Polyunsaturated fatty acids and inflammation: From molecular biology to the clinic*. Lipids [online]. 2003. 38 (4): 343–352 [cit. 21. 1. 2020]. DOI:10.1007/s11745-003-1068-y.
- [241] FERRUCCI L., CHERUBINI A., BANDINELLI S., BARTALI B., CORSI A., LAURETANI F., MARTIN A., ANDRES-LACUEVA C., SENIN U., GURALNIK J. M. *Relationship of Plasma Polyunsaturated Fatty Acids to Circulating Inflammatory Markers*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism [online]. 2006. 91 (2): 439–446 [cit. 21. 1. 2020]. DOI:10.1210/jc.2005-1303.
- [242] CALDER P. C. *n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases*. V: American Journal of Clinical Nutrition [online]. 2006. DOI:10.1093/ajcn/83.6.1505s.
- [243] LEV-TZION R., GRIFFITHS A. M., LEDDER O., TURNER D. *Omega 3 fatty acids (fish oil) for maintenance of remission in Crohn's disease*. Cochrane Database of Systematic Reviews [online]. 2014. [cit. 22. 1. 2020]. DOI:10.1002/14651858.CD006320.pub4.
- [244] MACDONALD A. *Omega-3 Fatty Acids as Adjunctive Therapy in Crohns Disease*. Gastroenterology Nursing [online]. 2006. 29 (4): 295–301 [cit. 22. 1. 2020]. DOI:10.1097/00001610-200607000-00005.
- [245] CHUANG C.-C., MCINTOSH M. K. *Potential Mechanisms by Which Polyphenol-Rich Grapes Prevent Obesity-Mediated Inflammation and Metabolic Diseases*. Annual Review of Nutrition [online]. 2011. 31 (1): 155–176. DOI:10.1146/annurev-nutr-072610-145149.
- [246] BOST J., MAROON A., MAROON J. *Natural anti-inflammatory agents for pain relief*. Surgical Neurology International [online]. 2010. 1 (1): 80. DOI:10.4103/2152-7806.73804.
- [247] SERGENT T., PIRONT N., MEURICE J., TOUSSAINT O., SCHNEIDER Y.-J. *Anti-inflammatory effects of dietary phenolic compounds in an in vitro model of inflamed human intestinal epithelium*. Chemico-Biological Interactions [online]. 2010. 188 (3): 659–667. DOI:10.1016/j.cbi.2010.08.007.
- [248] CARDONA F., ANDRÉS-LACUEVA C., TULIPANI S., TINAHONES F. J., QUEIPO-ORTUÑO M. I. *Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health*. The Journal of Nutritional Biochemistry [online]. 2013. 24 (8): 1415–1422. DOI:10.1016/j.jnutbio.2013.05.001.
- [249] SHORTT C., HASSELWANDER O., MEYNIER A., NAUTA A., FERNÁNDEZ E. N., PUTZ P., ROWLAND I., SWANN J., TÜRK J., VERMEIREN J., ANTOINE J.-M. *Systematic review of the effects of the intestinal microbiota on selected nutrients and non-nutrients*. European Journal of Nutrition [online]. 2018. 57 (1): 25–49. DOI:10.1007/s00394-017-1546-4.
- [250] DUEÑAS M., MUÑOZ-GONZÁLEZ I., CUEVA C., JIMÉNEZ-GIRÓN A., SÁNCHEZ-PATÁN F., SANTOS-BUELGA C., MORENO-ARRIBAS M. V., BARTOLOMÉ B. *A Survey of Modulation of Gut Microbiota by Dietary Polyphenols*. BioMed Research International [online]. 2015. 2015 : 1–15. DOI:10.1155/2015/850902.
- [251] STOTE K. S., CLEVIDENCE B. A., NOVOTNY J. A., HENDERSON T., RADECKI S. V,

- BAER D. J. *Effect of cocoa and green tea on biomarkers of glucose regulation, oxidative stress, inflammation and hemostasis in obese adults at risk for insulin resistance*. European Journal of Clinical Nutrition [online]. 2012. 66 (10): 1153–1159. DOI:10.1038/ejcn.2012.101.
- [252] AMBRIZ-PÉREZ D. L., LEYVA-LÓPEZ N., GUTIERREZ-GRIJALVA E. P., HEREDIA J. B. *Phenolic compounds: Natural alternative in inflammation treatment. A Review*. Cogent Food & Agriculture [online]. 2016. 2 (1): 1131412 [cit. 1. 12. 2019]. DOI:10.1080/23311932.2015.1131412.
- [253] GONZÁLEZ R., BALLESTER I., LÓPEZ-POSADAS R., SUÁREZ M. D., ZARZUELO A., MARTÍNEZ-AUGUSTIN O., SÁNCHEZ DE MEDINA F. *Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition [online]. 2011. 51 (4): 331–362. DOI:10.1080/10408390903584094.
- [254] NONES K., DOMMELS Y. E. M., MARTELL S., BUTTS C., MCNABB W. C., PARK Z. A., ZHU S., HEDDERLEY D., BARNETT M. P. G., ROY N. C. *The effects of dietary curcumin and rutin on colonic inflammation and gene expression in multidrug resistance gene-deficient (mdr1a -/-) mice, a model of inflammatory bowel diseases*. British Journal of Nutrition [online]. 2008. 101 (2): 169–181 [cit. 30. 1. 2020]. DOI:10.1017/S0007114508009847.
- [255] CAMACHO-BARQUERO L., VILLEGAS I., SÁNCHEZ-CALVO J. M., TALERO E., SÁNCHEZ-FIDALGO S., MOTILVA V., ALARCÓN DE LA LASTRA C. *Curcumin, a Curcuma longa constituent, acts on MAPK p38 pathway modulating COX-2 and iNOS expression in chronic experimental colitis*. International Immunopharmacology [online]. 2007. 7 (3): 333–342 [cit. 30. 1. 2020]. DOI:10.1016/j.intimp.2006.11.006.
- [256] SHAHCHERAGHI S. H., AYATOLLAHI J., LOTFI M. *Inhibitory effects of curcumin on sequel of infections and their signaling pathways*. Reviews in Medical Microbiology [online]. 2019. 30 (2): 113–121. DOI:10.1097/MRM.000000000000159.
- [257] NELSON K. M., DAHLIN J. L., BISSON J., GRAHAM J., PAULI G. F., WALTERS M. A. *The Essential Medicinal Chemistry of Curcumin*. Journal of Medicinal Chemistry [online]. 2017. 60 (5): 1620–1637 [cit. 14. 1. 2020]. DOI:10.1021/acs.jmedchem.6b00975.
- [258] IKIKI E. *Novel Drug Delivery Systems to Improve Bioavailability of Curcumin*. Journal of Bioequivalence & Bioavailability [online]. 2014. 06 (01): 1 [cit. 30. 1. 2020]. DOI:10.4172/jbb.1000172.
- [259] LIU W., ZHAI Y., HENG X., CHE F. Y., CHEN W., SUN D., ZHAI G. *Oral bioavailability of curcumin: problems and advancements*. Journal of Drug Targeting [online]. 2016. 24 (8): 694–702 [cit. 30. 1. 2020]. DOI:10.3109/1061186X.2016.1157883.
- [260] PETERSON J. J., BEECHER G. R., BHAGWAT S. A., DWYER J. T., GEBHARDT S. E., HAYTOWITZ D. B., HOLDEN J. M. *Flavanones in grapefruit, lemons, and limes: A compilation and review of the data from the analytical literature*. Journal of Food Composition and Analysis [online]. 2006. 19 : S74–S80. DOI:10.1016/j.jfca.2005.12.009.
- [261] KANDHARE A. D., LIU Z., MUKHERJEE A. A., BODHANKAR S. L. *Therapeutic Potential of Morin in Ovalbumin-induced Allergic Asthma Via Modulation of SUMF2/IL-13 and BLT2/NF-kB Signaling Pathway*. Current Molecular Pharmacology [online]. 2019. 12 (2): 122–138. DOI:10.2174/1874467212666190102105052.
- [262] GALVEZ J., COELHO G., CRESPO M. E., CRUZ T., RODRIGUEZ-CABEZAS M. E., CONCHA A., GONZALEZ M., ZARZUELO A. *Intestinal anti-inflammatory activity of morin on chronic experimental colitis in the rat*. Alimentary Pharmacology and Therapeutics [online]. 2001. 15 (12): 2027–2039 [cit. 31. 1. 2020]. DOI:10.1046/j.1365-2036.2001.01133.x.
- [263] ONG K. C., KHOO H.-E. *Biological effects of myricetin*. General Pharmacology: The Vascular System [online]. 1997. 29 (2): 121–126. DOI:10.1016/S0306-3623(96)00421-1.
- [264] SEMWAL D., SEMWAL R., COMBRINCK S., VILJOEN A. *Myricetin: A Dietary Molecule with Diverse Biological Activities*. Nutrients [online]. 2016. 8 (2): 90. DOI:10.3390/nu8020090.
- [265] MORLING J. R., BRODERICK C., YEOH S. E., KOLBACH D. N. *Rutosides for treatment of post-thrombotic syndrome*. Cochrane Database of Systematic Reviews [online]. 2018. DOI:10.1002/14651858.CD005625.pub4.
- [266] KWON K. H., MURAKAMI A., TANAKA T., OHIGASHI H. *Dietary rutin, but not its aglycone quercetin, ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice: attenuation of pro-inflammatory gene expression*. Biochemical Pharmacology [online]. 2005. 69 (3): 395–

- 406 [cit. 31. 1. 2020]. DOI:10.1016/j.bcp.2004.10.015.
- [267] PARKAR S. G., STEVENSON D. E., SKINNER M. A. *The potential influence of fruit polyphenols on colonic microflora and human gut health*. International Journal of Food Microbiology [online]. 2008. 124 (3): 295–298. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.017.
- [268] MANN J., TRUSWELL S. *Essentials of Human Nutrition*. 2012. B.m., Oxford University Press (OUP).
- [269] JOYCE S. A., BRACHMANN A. O., GLAZER I., LANGO L., SCHWÄR G., CLARKE D. J., BODE H. B. *Bacterial Biosynthesis of a Multipotent Stilbene*. Angewandte Chemie International Edition [online]. 2008. 47 (10): 1942–1945. DOI:10.1002/anie.200705148.
- [270] HALL J. A., DOMINY J. E., LEE Y., PUIGSERVER P. *The sirtuin family's role in aging and age-associated pathologies*. Journal of Clinical Investigation [online]. 2013. 123 (3): 973–979 [cit. 30. 1. 2020]. DOI:10.1172/JCI64094.
- [271] TIMMERS S., KONINGS E., BILET L., HOUTKOOPER R. H., VAN DE WEIJER T., GOOSSENS G. H., HOEKS J., VAN DER KRIEKEN S., RYU D., KERSTEN S., MOONEN-KORNIPS E., HESSELINK M. K. C., KUNZ I., SCHRAUWEN-HINDERLING V. B., BLAAK E. E., AUWERX J., SCHRAUWEN P. *Calorie Restriction-like Effects of 30 Days of Resveratrol Supplementation on Energy Metabolism and Metabolic Profile in Obese Humans*. Cell Metabolism [online]. 2011. 14 (5): 612–622 [cit. 30. 1. 2020]. DOI:10.1016/j.cmet.2011.10.002.
- [272] MARTÍN A. R., VILLEGAS I., SÁNCHEZ-HIDALGO M., DE LA LASTRA C. A. *The effects of resveratrol, a phytoalexin derived from red wines, on chronic inflammation induced in an experimentally induced colitis model*. British Journal of Pharmacology [online]. 2006. 147 (8): 873–885 [cit. 31. 1. 2020]. DOI:10.1038/sj.bjp.0706469.
- [273] MAZUR W. M., UEHARA M., ADLERCREUTZ H., WÄHÄLÄ K. *Phyto-oestrogen content of berries, and plasma concentrations and urinary excretion of enterolactone after a single strawberry-meal in human subjects*. British Journal of Nutrition [online]. 2000. 83 (4): 381–387. DOI:10.1017/S0007114500000489.
- [274] BULKOVÁ V. *Rostlinné potraviny*. 2011. Brno, Národní centrum ošetrovatelství a nelekárských zdravotnických oborů.
- [275] MILANI A., BASIRNEJAD M., SHAHBAZI S., BOLHASSANI A. *Carotenoids: biochemistry, pharmacology and treatment*. British Journal of Pharmacology [online]. 2017. 174 (11): 1290–1324. DOI:10.1111/bph.13625.
- [276] WALSTON J., XUE Q., SEMBA R. D., FERRUCCI L., CAPPOLA A. R., RICKS M., GURALNIK J., FRIED L. P. *Serum Antioxidants, Inflammation, and Total Mortality in Older Women*. American Journal of Epidemiology [online]. 2006. 163 (1): 18–26. DOI:10.1093/aje/kwj007.
- [277] TAPIERO H., TOWNSEND D. ., TEW K. . *The role of carotenoids in the prevention of human pathologies*. Biomedicine & Pharmacotherapy [online]. 2004. 58 (2): 100–110. DOI:10.1016/j.biopha.2003.12.006.
- [278] SAINI R. K., NILE S. H., PARK S. W. *Carotenoids from fruits and vegetables: Chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities*. Food Research International [online]. 2015. 76 : 735–750. DOI:10.1016/j.foodres.2015.07.047.
- [279] RAO A., RAO L. *Carotenoids and human health*. Pharmacological Research [online]. 2007. 55 (3): 207–216. DOI:10.1016/j.phrs.2007.01.012.
- [280] KHOO H.-E., PRASAD K. N., KONG K.-W., JIANG Y., ISMAIL A. *Carotenoids and Their Isomers: Color Pigments in Fruits and Vegetables*. Molecules [online]. 2011. 16 (2): 1710–1738. DOI:10.3390/molecules16021710.
- [281] LAU F. C., BIELINSKI D. F., JOSEPH J. A. *Inhibitory effects of blueberry extract on the production of inflammatory mediators in lipopolysaccharide-activated BV2 microglia*. Journal of Neuroscience Research [online]. 2007. 85 (5): 1010–1017. DOI:10.1002/jnr.21205.
- [282] PATURI G., MANDIMIKA T., BUTTS C. A., ZHU S., ROY N. C., MCNABB W. C., ANSELL J. *Influence of dietary blueberry and broccoli on cecal microbiota activity and colon morphology in *mdr1a*<sup>-/-</sup> mice, a model of inflammatory bowel diseases*. Nutrition [online]. 2012. 28 (3): 324–330. DOI:10.1016/j.nut.2011.07.018.
- [283] KALT W., DUFOUR D. *Health Functionality of Blueberries*. HortTechnology [online]. 1997. 7 (3): 216–221. DOI:10.21273/HORTTECH.7.3.216.

- [284] MADHAVI D. ., BOMSER J., SMITH M. A. ., SINGLETARY K. *Isolation of bioactive constituents from Vaccinium myrtillus (bilberry) fruits and cell cultures*. Plant Science [online]. 1998. 131 (1): 95–103. DOI:10.1016/S0168-9452(97)00241-0.
- [285] NETO C. C. *Cranberry and blueberry: Evidence for protective effects against cancer and vascular diseases*. Molecular Nutrition and Food Research [online]. 2007. 51 (6): 652–664. DOI:10.1002/mnfr.200600279.
- [286] PRIYADARSINI K. *The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent*. Molecules [online]. 2014. 19 (12): 2091–20112. DOI:10.3390/molecules191220091.
- [287] HENROTIN Y., CLUTTERBUCK A. L., ALLAWAY D., LODWIG E. M., HARRIS P., MATHY-HARTERT M., SHAKIBAEI M., MOBASHERI A. *Biological actions of curcumin on articular chondrocytes*. Osteoarthritis and Cartilage [online]. 2010. 18 (2): 141–149. DOI:10.1016/j.joca.2009.10.002.
- [288] GARCÍA-MEDIAVILLA V., CRESPO I., COLLADO P. S., ESTELLER A., SÁNCHEZ-CAMPOS S., TUÑÓN M. J., GONZÁLEZ-GALLEGO J. *The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells*. European Journal of Pharmacology [online]. 2007. 557 (2–3): 221–229. DOI:10.1016/j.ejphar.2006.11.014.
- [289] AGGARWAL B. B., HARIKUMAR K. B. *Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology [online]. 2009. 41 (1): 40–59. DOI:10.1016/j.biocel.2008.06.010.
- [290] BAGAD A. S., JOSEPH J. A., BHASKARAN N., AGARWAL A. *Comparative Evaluation of Anti-Inflammatory Activity of Curcuminoids, Turmerones, and Aqueous Extract of Curcuma longa*. Advances in Pharmacological Sciences [online]. 2013. 2013 : 1–7 [cit. 14. 1. 2020]. DOI:10.1155/2013/805756.
- [291] AKRAM M., AHMED A., USMANGHANI K., HANNAN A., MOHIUDDIN E., ASIF M. *CURCUMA LONGA AND CURCUMIN: A REVIEW ARTICLE*. Rom. J. Biol. - Plant Biol. 2010. 55 (2): 65–70.
- [292] BALIGA M. S., JOSEPH N., VENKATARANGANNA M. V., SAXENA A., PONEMONE V., FAYAD R. *Curcumin, an active component of turmeric in the prevention and treatment of ulcerative colitis: preclinical and clinical observations*. Food & Function [online]. 2012. 3 (11): 1109. DOI:10.1039/c2fo30097d.
- [293] PRASAD S., GUPTA S. C., TYAGI A. K., AGGARWAL B. B. *Curcumin, a component of golden spice: From bedside to bench and back*. Biotechnology Advances [online]. 2014. 32 (6): 1053–1064. DOI:10.1016/j.biotechadv.2014.04.004.
- [294] MCKAY D. L., BLUMBERG J. B. *A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (Mentha piperita L.)*. Phytotherapy Research [online]. 2006. 20 (8): 619–633 [cit. 6. 2. 2020]. DOI:10.1002/ptr.1936.
- [295] HERRO E., JACOB S. E. *Mentha piperita (Peppermint)*. Dermatitis [online]. 2010. 21 (6): 327–329. DOI:10.2310/6620.2011.10080.
- [296] NAIR B. *Final report on the safety assessment of Mentha Piperita (Peppermint) Oil, Mentha Piperita (Peppermint) Leaf Extract, Mentha Piperita (Peppermint) Leaf, and Mentha Piperita (Peppermint) Leaf Water*. International journal of toxicology [online]. 2001. 20 Suppl 3 : 61–73 [cit. 6. 2. 2020]. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11766133>>
- [297] AREIAS F. ., VALENTÃO P., ANDRADE P. ., FERRERES F., SEABRA R. . *Phenolic fingerprint of peppermint leaves*. Food Chemistry [online]. 2001. 73 (3): 307–311. DOI:10.1016/S0308-8146(00)00302-2.
- [298] CHANDRASHEKHAR V. M., HALAGALI K. S., NIDAVANI R. B., SHALAVADI M. H., BIRADAR B. S., BISWAS D., MUCHCHANDI I. S. *Anti-allergic activity of German chamomile (Matricaria recutita L.) in mast cell mediated allergy model*. Journal of Ethnopharmacology [online]. 2011. 137 (1): 336–340. DOI:10.1016/j.jep.2011.05.029.
- [299] MCKAY D. L., BLUMBERG J. B. *A Review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (Matricaria recutita L.)*. Phytotherapy Research [online]. 2006. 20 (7): 519–530. DOI:10.1002/ptr.1900.

- [300] PAVESI V. C. S., LOPEZ T. C. C., MARTINS M. A. T., SANT'ANA FILHO M., BUSSADORI S. K., FERNANDES K. P. S., MESQUITA-FERRARI R. A., MARTINS M. D. *Healing action of topical chamomile on 5-fluorouracil induced oral mucositis in hamster*. Supportive Care in Cancer [online]. 2011. 19 (5): 639–646. DOI:10.1007/s00520-010-0875-0.
- [301] SRIVASTAVA J. K., GUPTA S. *Antiproliferative and Apoptotic Effects of Chamomile Extract in Various Human Cancer Cells*. Journal of Agricultural and Food Chemistry [online]. 2007. 55 (23): 9470–9478. DOI:10.1021/jf071953k.
- [302] AMSTERDAM J. D., LI Y., SOELLER I., ROCKWELL K., MAO J. J., SHULTS J. A. *Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Oral Matricaria recutita (Chamomile) Extract Therapy for Generalized Anxiety Disorder*. Journal of Clinical Psychopharmacology [online]. 2009. 29 (4): 378–382. DOI:10.1097/JCP.0b013e3181ac935c.
- [303] JAYAPRAKASHA G. K., RAO L. J. M. *Chemistry, Biogenesis, and Biological Activities of Cinnamomum zeylanicum*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition [online]. 2011. 51 (6): 547–562. DOI:10.1080/10408391003699550.
- [304] KWON H.-K., HWANG J.-S., SO J.-S., LEE C.-G., SAHOO A., RYU J.-H., JEON W. K., KO B. S., IM C.-R., LEE S. H., PARK Z. Y., IM S.-H. *Cinnamon extract induces tumor cell death through inhibition of NF $\kappa$ B and API*. BMC Cancer [online]. 2010. 10 (1): 392. DOI:10.1186/1471-2407-10-392.
- [305] GUNAWARDENA D., SHANMUGAM K., LOW M., BENNETT L., GOVINDARAGHAVAN S., HEAD R., OOI L., MÜNCH G. *Determination of anti-inflammatory activities of standardised preparations of plant- and mushroom-based foods*. European Journal of Nutrition [online]. 2014. 53 (1): 335–343. DOI:10.1007/s00394-013-0531-9.
- [306] ALLEN R. W., SCHWARTZMAN E., BAKER W. L., COLEMAN C. I., PHUNG O. J. *Cinnamon Use in Type 2 Diabetes: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis*. The Annals of Family Medicine [online]. 2013. 11 (5): 452–459. DOI:10.1370/afm.1517.
- [307] GRUENWALD J., FREDER J., ARMBRUESTER N. *Cinnamon and Health*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition [online]. 2010. 50 (9): 822–834. DOI:10.1080/10408390902773052.
- [308] HSIANG C.-Y., LO H.-Y., HUANG H.-C., LI C.-C., WU S.-L., HO T.-Y. *Ginger extract and zingerone ameliorated trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis in mice via modulation of nuclear factor- $\kappa$ B activity and interleukin-1 $\beta$  signalling pathway*. Food Chemistry [online]. 2013. 136 (1): 170–177 [cit. 31. 1. 2020]. DOI:10.1016/j.foodchem.2012.07.124.
- [309] CHIEN T. Y., CHEN L. G., LEE C. J., LEE F. Y., WANG C. C. *Anti-inflammatory constituents of Zingiber zerumbet*. Food Chemistry [online]. 2008. 110 (3): 584–589. DOI:10.1016/j.foodchem.2008.02.038.
- [310] STOILOVA I., KRASTANOV A., STOYANOVA A., DENEV P., GARGOVA S. *Antioxidant activity of a ginger extract (Zingiber officinale)*. Food Chemistry [online]. 2007. 102 (3): 764–770. DOI:10.1016/j.foodchem.2006.06.023.
- [311] GRZANNA R., LINDMARK L., FRONDOZA C. G. *Ginger—An Herbal Medicinal Product with Broad Anti-Inflammatory Actions*. Journal of Medicinal Food [online]. 2005. 8 (2): 125–132. DOI:10.1089/jmf.2005.8.125.
- [312] ALI B. H., BLUNDEN G., TANIRA M. O., NEMMAR A. *Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (Zingiber officinale Roscoe): A review of recent research*. Food and Chemical Toxicology [online]. 2008. 46 (2): 409–420. DOI:10.1016/j.fct.2007.09.085.
- [313] THOMSON M., AL-QATTAN K. K., AL-SAWAN S. M., ALNAQEEB M. A., KHAN I., ALI M. *The use of ginger (Zingiber officinale Rosc.) as a potential anti-inflammatory and antithrombotic agent*. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids [online]. 2002. 67 (6): 475–478. DOI:10.1054/plf.2002.0441.
- [314] STRANDÅS C., KAMAL-ELDIN A., ANDERSSON R., ÅMAN P. *Phenolic glucosides in bread containing flaxseed*. Food Chemistry [online]. 2008. 110 (4): 997–999. DOI:10.1016/j.foodchem.2008.02.088.
- [315] GOYAL A., SHARMA V., UPADHYAY N., GILL S., SIHAG M. *Flax and flaxseed oil: an ancient medicine & modern functional food*. Journal of Food Science and Technology

- [online]. 2014. 51 (9): 1633–1653. DOI:10.1007/s13197-013-1247-9.
- [316] MOHAMMADI-SARTANG M., MAZLOOM Z., RAEISI-DEHKORDI H., BARATI-BOLDAJI R., BELLISSIMO N., TOTOSY DE ZEPETNEK J. O. *The effect of flaxseed supplementation on body weight and body composition: a systematic review and meta-analysis of 45 randomized placebo-controlled trials*. *Obesity Reviews* [online]. 2017. 18 (9): 1096–1107. DOI:10.1111/obr.12550.
- [317] REN G.-Y., CHEN C.-Y., CHEN G.-C., CHEN W.-G., PAN A., PAN C.-W., ZHANG Y.-H., QIN L.-Q., CHEN L.-H. *Effect of Flaxseed Intervention on Inflammatory Marker C-Reactive Protein: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials*. *Nutrients* [online]. 2016. 8 (3): 136. DOI:10.3390/nu8030136.
- [318] CUNNANE S. C., GANGULI S., MENARD C., LIEDE A. C., HAMADEH M. J., CHEN Z.-Y., WOLEVER T. M. S., JENKINS D. J. A. *High  $\alpha$ -linolenic acid flaxseed ( *Linum usitatissimum* ):some nutritional properties in humans*. *British Journal of Nutrition* [online]. 1993. 69 (2): 443–453. DOI:10.1079/BJN19930046.
- [319] NEDOVIC V., KALUSEVIC A., MANOJLOVIC V., LEVIC S., BUGARSKI B. *An overview of encapsulation technologies for food applications*. *Procedia Food Science* [online]. 2011. 1 : 1806–1815. DOI:10.1016/j.profoo.2011.09.265.
- [320] ANAL A. K., SINGH H. *Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery*. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2007. 18 (5): 240–251. DOI:10.1016/j.tifs.2007.01.004.
- [321] DIAS D. R., BOTREL D. A., DE R. V., FERNANDES B., BORGES S. V. *Encapsulation as a tool for bioprocessing of functional foods* [online]. 2017. [cit. 14. 11. 2017]. DOI:10.1016/j.cofs.2017.02.001.
- [322] DIAS D. R., BOTREL D. A., FERNANDES R. V. D. B., BORGES S. V. *Encapsulation as a tool for bioprocessing of functional foods*. *Current Opinion in Food Science* [online]. 2017. 13 : 31–37. DOI:10.1016/j.cofs.2017.02.001.
- [323] MARTÍN M. J., LARA-VILLOSLADA F., RUIZ M. A., MORALES M. E. *Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* [online]. 2015. 27 : 15–25 [cit. 14. 11. 2017]. DOI:10.1016/j.ifset.2014.09.010.
- [324] MAZZITELLI S., CAPRETTO L., QUINCI F., PIVA R., NASTRUZZI C. *Preparation of cell-encapsulation devices in confined microenvironment*. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2013. 65 (11–12): 1533–1555. DOI:10.1016/j.addr.2013.07.021.
- [325] FANG Z., BHANDARI B. *Encapsulation of polyphenols – a review*. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2010. 21 (10): 510–523. DOI:10.1016/j.tifs.2010.08.003.
- [326] MARTIN-DEJARDIN F., EBEL B., LEMETAIS G., NGUYEN THI MINH H., GERVAIS P., CACHON R., CHAMBIN O. *A way to follow the viability of encapsulated *Bifidobacterium bifidum* subjected to a freeze-drying process in order to target the colon: Interest of flow cytometry*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2013. 49 (2): 166–174. DOI:10.1016/j.ejps.2013.02.015.
- [327] DESAI K. G. H., JIN PARK H. *Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients*. *Drying Technology* [online]. 2005. 23 (7): 1361–1394. DOI:10.1081/DRT-200063478.
- [328] LEONG J. Y., LAM W. H., HO K. W., VOO W. P., LEE M. F. X., LIM H. P., LIM S. L., TEY B. T., PONCELET D., CHAN E. S. *Advances in fabricating spherical alginate hydrogels with controlled particle designs by ionotropic gelation as encapsulation systems*. *Particuology* [online]. 2016. 24 : 44–60. DOI:10.1016/j.partic.2015.09.004.
- [329] DONG Q.-Y., CHEN M.-Y., XIN Y., QIN X.-Y., CHENG Z., SHI L.-E., TANG Z.-X. *Alginate-based and protein-based materials for probiotics encapsulation: a review*. *International Journal of Food Science & Technology* [online]. 2013. 48 (7): 1339–1351. DOI:10.1111/ijfs.12078.
- [330] SATHYABAMA S., RANJITH KUMAR M., BRUNTHA DEVI P., VIJAYABHARATHI R., BRINDHA PRIYADHARISINI V. *Co-encapsulation of probiotics with prebiotics on alginate matrix and its effect on viability in simulated gastric environment*. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2014. 57 (1): 419–425. DOI:10.1016/j.lwt.2013.12.024.
- [331] BÜCHI. *Návod k použiti: Enkapsulátor B-395 Pro*. 2011.



- [332] *Československý lékopis: Pharmacopoea Bohemoslovaca*. 1987. Praha, Avicenum.
- [333] SINGLETON V. L., ROSSI J. A. *Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents*. American Journal of Enology and Viticulture. 1965. 16 (3): 178–182.
- [334] STONER G. D. *Ginger: Is it Ready for Prime Time?*. Cancer Prevention Research [online]. 2013. 6 (4): 257–262. DOI:10.1158/1940-6207.CAPR-13-0055.
- [335] CHANG C. C., YANG M. H., WEN H. M., CHERN J. C. *Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colometric methods*. Journal of Food and Drug Analysis. 2002. 10 (3): 178–182.
- [336] YAMAMOTO M., MASUI T., SUOYAMA K., YOKOTA M., NAKAGOMI K., NAKAZAWA H. *Anti-inflammatory Active Constituents of Aloe arborescens Miller*. Agricultural and Biological Chemistry [online]. 1991. 55 (6): 1627–1629 [cit. 29. 5. 2020]. DOI:10.1271/abb1961.55.1627.
- [337] CHAUSER-VOLFSON WOLFSON E., GUTTERMAN Y. *Aloes. Homonataloin and aloenin are important bioactive components for use in cosmetic and medicinal industries*. Planta Medica [online]. 2009. 75 (09): PD2. DOI:10.1055/s-0029-1234481.
- [338] SHIM S.-M., KWON H. *ASSESSING ABSORBABILITY OF BIOACTIVE COMPONENTS IN ALOE USING IN VITRO DIGESTION MODEL WITH HUMAN INTESTINAL CELL*. Journal of Food Biochemistry [online]. 2010. 34 (2): 425–438 [cit. 29. 5. 2020]. DOI:10.1111/j.1745-4514.2009.00289.x.
- [339] KOSURU R. Y., ROY A., DAS S. K., BERA S. *Galic Acid and Gallates in Human Health and Disease: Do Mitochondria Hold the Key to Success?*. Molecular Nutrition & Food Research [online]. 2018. 62 (1): 1700699 [cit. 4. 6. 2020]. DOI:10.1002/mnfr.201700699.
- [340] LOU Z., WANG H., RAO S., SUN J., MA C., LI J. *P-Coumaric acid kills bacteria through dual damage mechanisms*. Food Control [online]. 2012. 25 (2): 550–554. DOI:10.1016/j.foodcont.2011.11.022.
- [341] PRAGASAM S. J., VENKATESAN V., RASOOL M. *Immunomodulatory and anti-inflammatory effect of p-coumaric acid, a common dietary polyphenol on experimental inflammation in rats*. Inflammation [online]. 2013. 36 (1): 169–176. DOI:10.1007/s10753-012-9532-8.
- [342] ALI F., RAHUL, NAZ F., JYOTI S., SIDDIQUE Y. H. *Health functionality of apigenin: A review*. International Journal of Food Properties [online]. 2017. 20 (6): 1197–1238 [cit. 29. 5. 2020]. DOI:10.1080/10942912.2016.1207188.
- [343] EHRENKRANZ J. R. L., LEWIS N. G., KAHN C. R., ROTH J. *Phlorizin: A review* [online]. B.m., John Wiley & Sons, Ltd. 1. január 2005. DOI:10.1002/dmrr.532.
- [344] MORRISON M., VAN DER HEIJDEN R., HEERINGA P., KAIJZEL E., VERSCHUREN L., BLOMHOFF R., KOOISTRA T., KLEEMANN R. *Epicatechin attenuates atherosclerosis and exerts anti-inflammatory effects on diet-induced human-CRP and NFκB invivo*. Atherosclerosis [online]. 2014. 233 (1): 149–156. DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2013.12.027.
- [345] TAJIK N., TAJIK M., MACK I., ENCK P. *The potential effects of chlorogenic acid, the main phenolic components in coffee, on health: a comprehensive review of the literature* [online]. B.m., Dr. Dietrich Steinkopff Verlag GmbH and Co. KG. 1. október 2017. DOI:10.1007/s00394-017-1379-1.
- [346] COUTEAU D., MCCARTNEY A. L., GIBSON G. R., WILLIAMSON G. *Isolation and characterization of human colonic bacteria able to hydrolyse chlorogenic acid*. Journal of Applied Microbiology [online]. 2001. 90 (6): 873–881. DOI:10.1046/j.1365-2672.2001.01316.x.
- [347] PRIYADARSINI K. I. *Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells*. Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews [online]. 2009. 10 (2): 81–95. DOI:10.1016/j.jphotochemrev.2009.05.001.
- [348] BOON C. S., MCCLEMENTS D. J., WEISS J., DECKER E. A. *Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition [online]. 2010. 50 (6): 515–532. DOI:10.1080/10408390802565889.
- [349] ARTS M. J. T. J., HAENEN G. R. M. M., VOSS H. P., BAST A. *Antioxidant capacity of reaction*

- products limits the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay.* Food and Chemical Toxicology [online]. 2004. 42 (1): 45–49. DOI:10.1016/j.fct.2003.08.004.
- [350] MAO Q.-Q., XU X.-Y., CAO S.-Y., GAN R.-Y., CORKE H., BETA T., LI H.-B. *Bioactive Compounds and Bioactivities of Ginger (Zingiber officinale Roscoe)*. Foods [online]. 2019. 8 (6): 185. DOI:10.3390/foods8060185.
- [351] LI Y., HONG Y., HAN Y., WANG Y., XIA L. *Chemical characterization and antioxidant activities comparison in fresh, dried, stir-frying and carbonized ginger*. Journal of Chromatography B [online]. 2016. 1011 : 223–232. DOI:10.1016/j.jchromb.2016.01.009.
- [352] POKORNÁ M. *Probiotika pro dětskou výživu* [online]. B.m., 2019. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. DOI:10.1108/nfs.2008.01738dab.014.
- [353] MATOUŠKOVÁ P. *Využití různých technik enkapsulace k řízenému uvolňování aktivních látek v potravinářských a kosmetických přípravcích*. B.m., 2015. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. 156 s. Vedoucí dizertační práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
- [354] CIAPETTI G., CENNI E., PRATELLI L., PIZZOFERRATO A. *In vitro evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay*. Biomaterials [online]. 1993. 14 (5): 359–364. DOI:10.1016/0142-9612(93)90055-7.

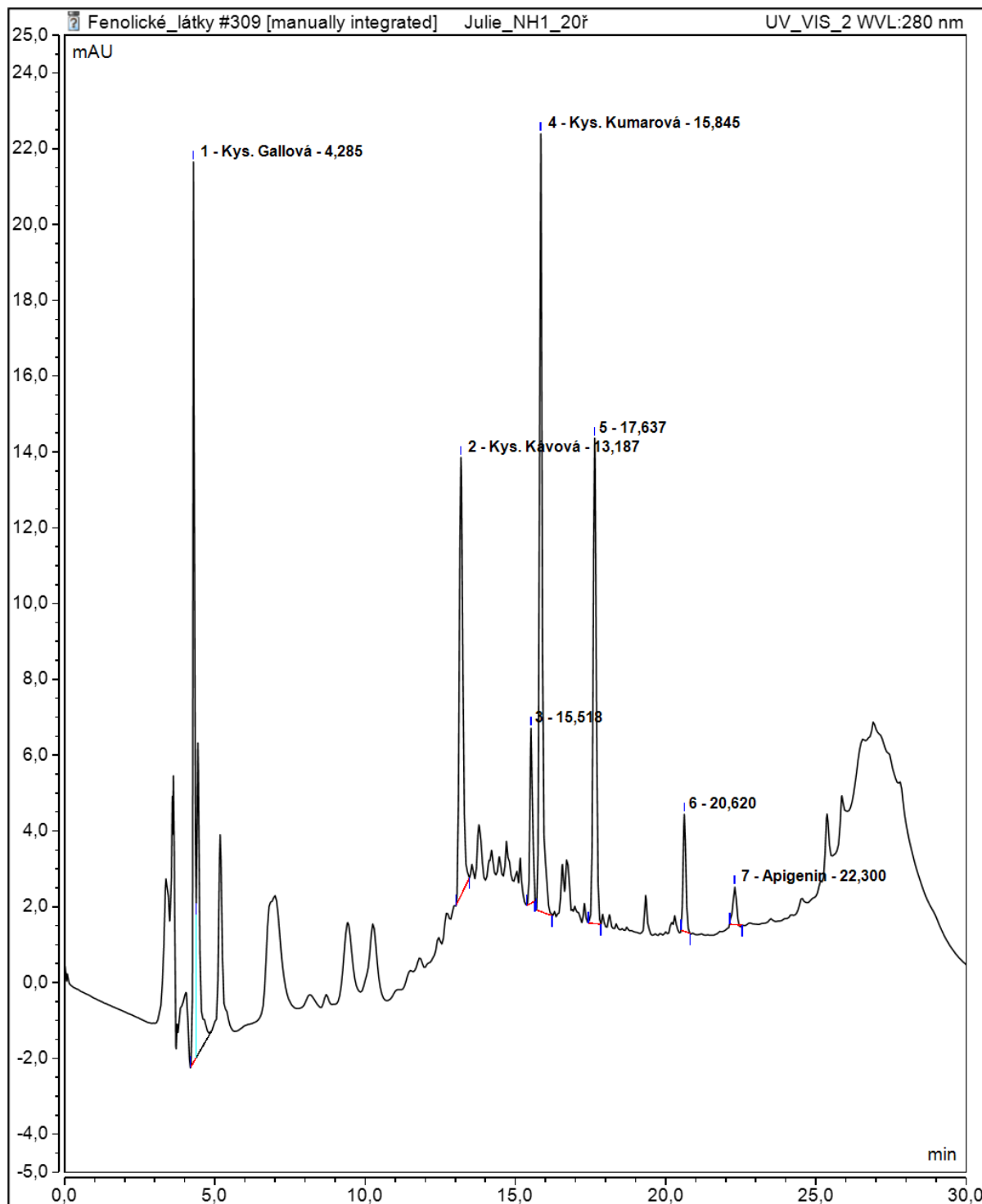
## 8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

<b>ABTS<sup>•+</sup></b>	2,2'-azino-bis-(3-etylbenzotiazolín)-6-sulfónová kyselina
<b>ACE</b>	enzým konvertujúci angiotenzín
<b>ALA</b>	$\alpha$ -linolenová kyselina
<b>BCFA</b>	mastné kyseliny s rozvetveným reťazcom („branched-chain fatty acids“)
<b>BDNF</b>	mozgový neurotrofický faktor („brain-derived neurotropic factor“)
<b>Cc</b>	pozitívna kontrola („cell control“)
<b>CFU</b>	jednotky tvoriace kolónie („colony forming units“)
<b>CLA</b>	konjugovaná kyselina linolová
<b>COX-2</b>	cyklooxygenáza-2
<b>DHA</b>	kyselina dokozahexaénová
<b>EDTA</b>	kyselina etyléndiamínotetraoctová
<b>EMEM</b>	„Eagle's Minimum Essential Medium“
<b>EPA</b>	kyselina eikosapentaénová
<b>EtOH</b>	etanol
<b>FBS</b>	fetálne bovinné sérum
<b>FOS</b>	fruktooligosacharidy
<b>GABA</b>	$\gamma$ -aminomaslová kyselina
<b>GAE</b>	ekvivalent kyseliny gallovej („gallic acid equivalent“)
<b>GIT</b>	gastrointestinálny trakt
<b>GOS</b>	galaktooligosacharidy
<b>HDACi</b>	histónové deacetylázové inhibítory
<b>IBD</b>	nešpecifické zápalové črevné ochorenie („inflammatory bowel disease“)
<b>IBS</b>	syndróm dráždivého tračníka („irritable bowel disease“)
<b>IF<math>\gamma</math></b>	interferón- $\gamma$
<b>IgA</b>	imunoglobulín typu A
<b>IL</b>	interleukín (v texte vždy doplnené o konkrétne identifikačné číslo)
<b>MAMP</b>	molekulárne vzory súvisiace s mikróbmi („microbe-associated molecular patterns“)
<b>MMP</b>	matrix-metallo-proteináza („matrix metalloproteinase“)
<b>MOS</b>	mannanooligosacharidy
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenylný tetrazolium bromid
<b>NEAA</b>	roztok neesenciálnych aminokyselín
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	nukleárny faktor kappa B („nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells“)
<b>NLR</b>	receptory podobné oligomerizačným doménam viažucim nukleotidy („nucleotide-binding oligomerization domains-like receptors“)
<b>NOS</b>	NO-syntáza
<b>NSAID</b>	nesteroidné antiflogistiká

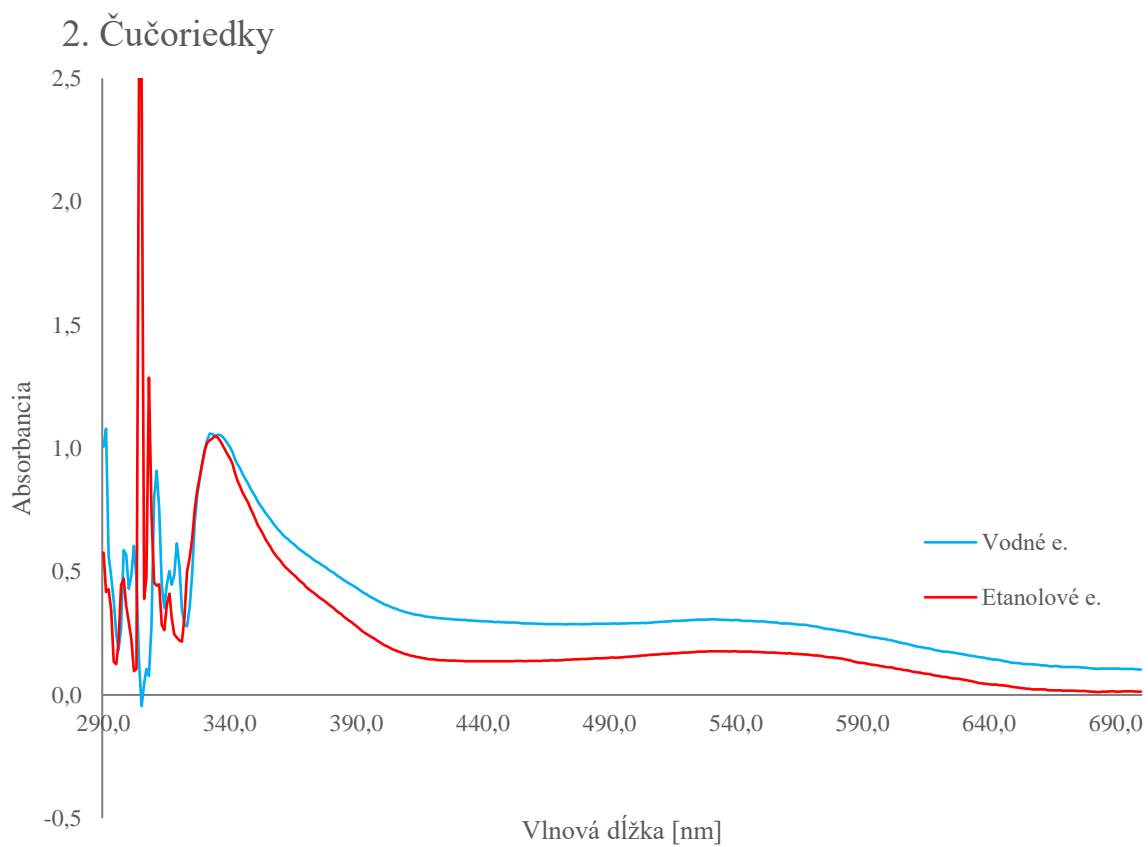
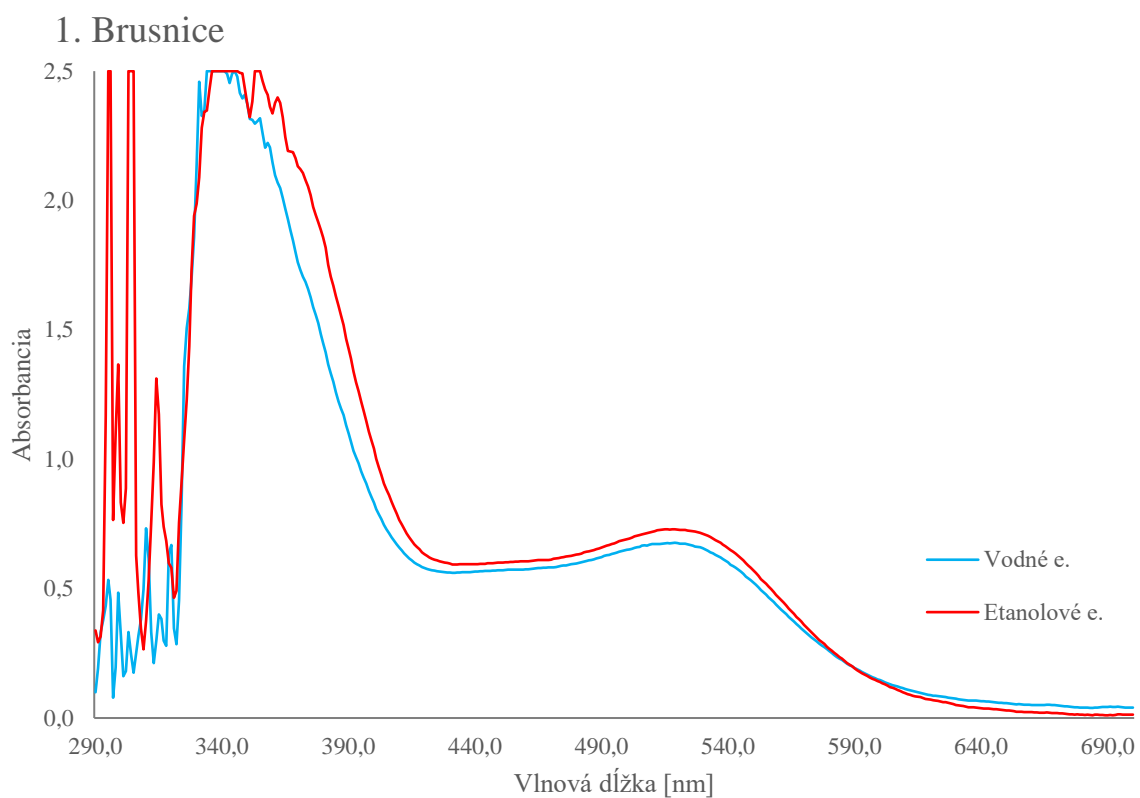
<b>PAMP</b>	molekulárne vzory súvisiace s patogénom („pathogen-associated molecular patterns“)
<b>PBS</b>	fosfátový pufer
<b>PG</b>	prostaglandíny
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	receptory aktivované proliferátormi peroxizómov („peroxisome proliferator-activated receptors“)
<b>PRR</b>	receptory rozpoznávajúce (bakteriálny) vzor („pattern recognition receptors“)
<b>PUFA</b>	polynenasýtené mastné kyseliny
<b>RCF</b>	relatívna odstredivá sila („relative centrifugal force“)
<b>ROS</b>	reaktívne formy kyslíku („reactive oxygen species“)
<b>RP-HPLC</b>	vysokoučinná kvapalinová chromatografia s reverznými fázami
<b>SCFA</b>	masťné kyseliny s krátkym reťazcom („short-chain fatty acids“)
<b>SDS</b>	dodecylsírán sodný
<b>SIBO</b>	syndróm bakteriálneho prerastenia v tenkom čreve
<b>TEAC</b>	„Trolox Equivalent Antioxidant Capacity“
<b>TGF<math>\beta</math></b>	transformačný rastový faktor $\beta$
<b>TLR</b>	toll-like receptory
<b>TMA</b>	trimetylamín
<b>TMAO</b>	trimetylamín-N-oxid
<b>TNF</b>	tumor nekrotizujúci faktor
<b>TOS</b>	trans-galaktooligosacharidy
<b>T<sub>reg</sub></b>	regulačné T-lymfocyty
<b>TROLOX</b>	6-hydroxy-2,5,7,8-tetrametylchroman-2-karboxylová kyselina
<b>Vc</b>	„vehicle control“
<b>VSL #3</b>	probiotický komplex pozostávajúci z druhov rodu <i>Lactobacillus</i> ( <i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. acidophilus</i> a <i>L. delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i> ), <i>Bifidobacterium</i> ( <i>B. longum</i> , <i>B. breve</i> a <i>B. infantis</i> ) a <i>Streptococcus salivarius</i> spp. <i>thermophilus</i>
<b>XOS</b>	xylooligosacharidy

## 9 PRÍLOHY

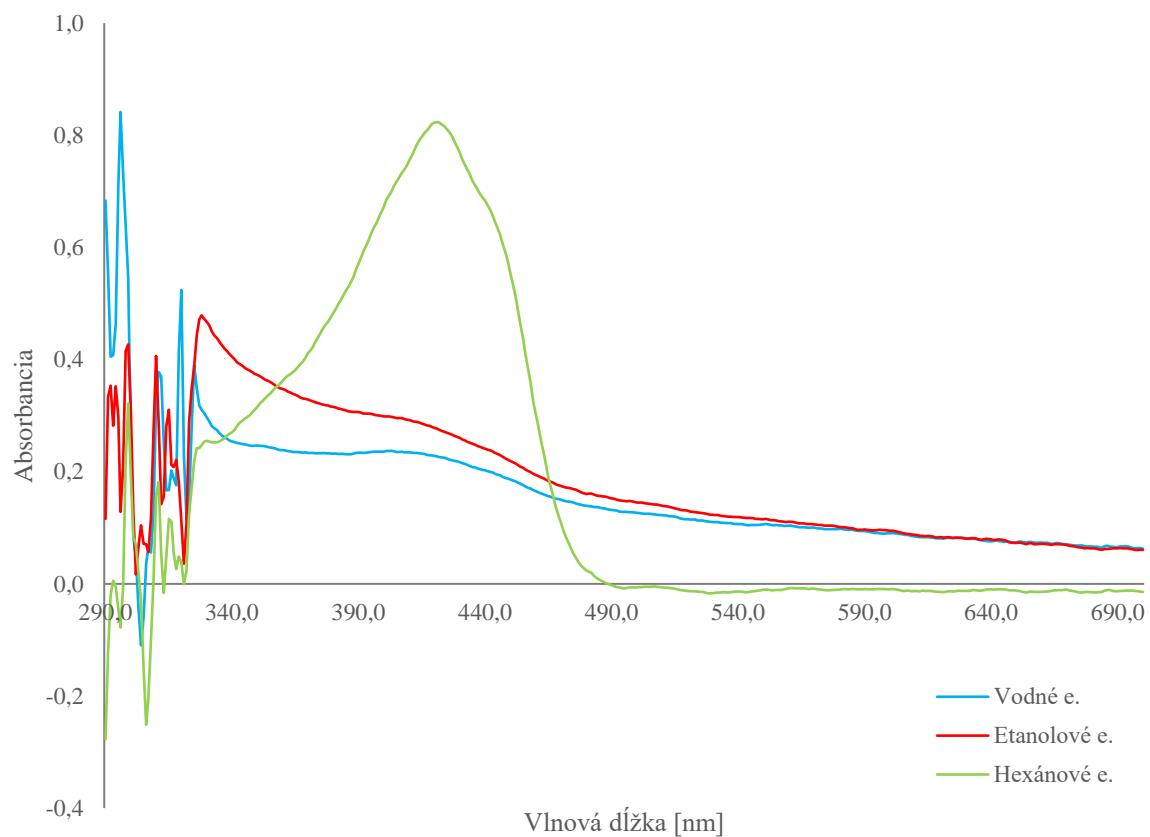
*Príloha 1: Chromatogram RP-HPLC s UV/VIS detekciou – zastúpenie fenolických zlúčenín vo vodnom roztoku brusníc*



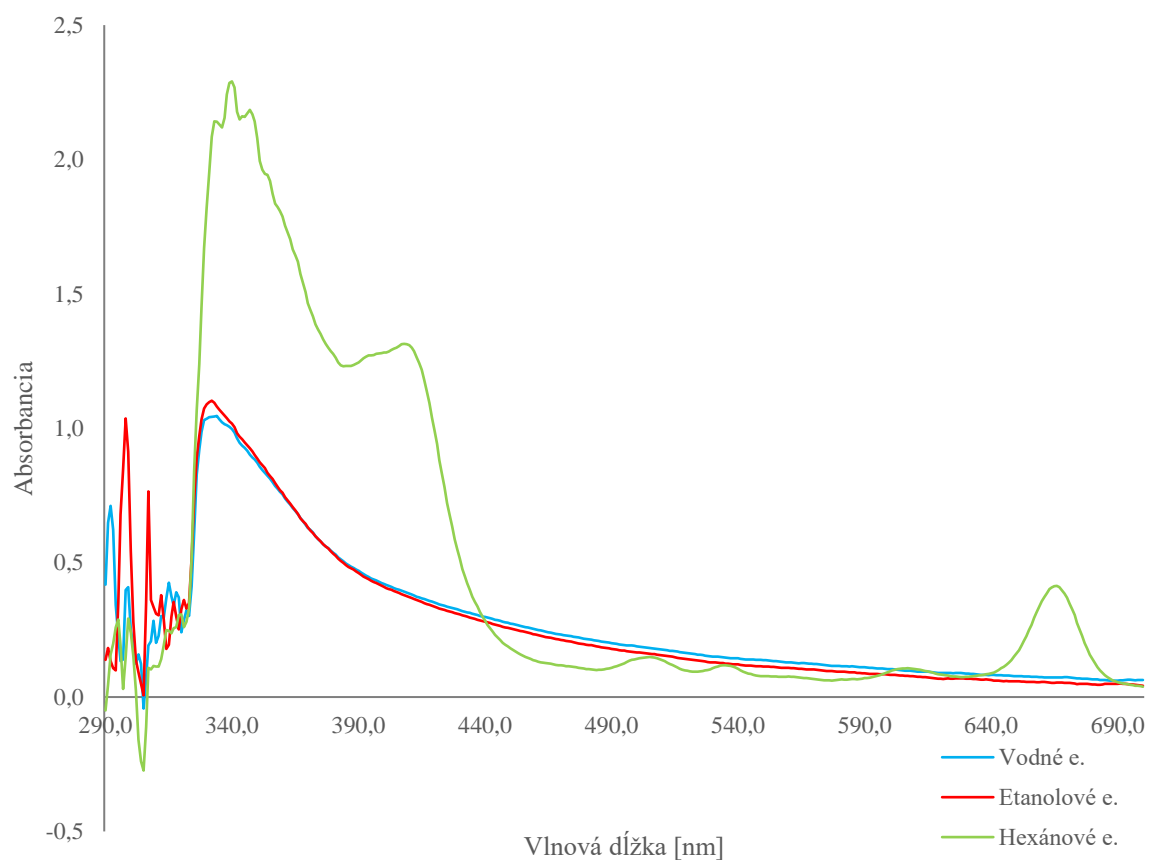
**Príloha 2: UV-VIS spektrá pre jednotlivé vzorky**



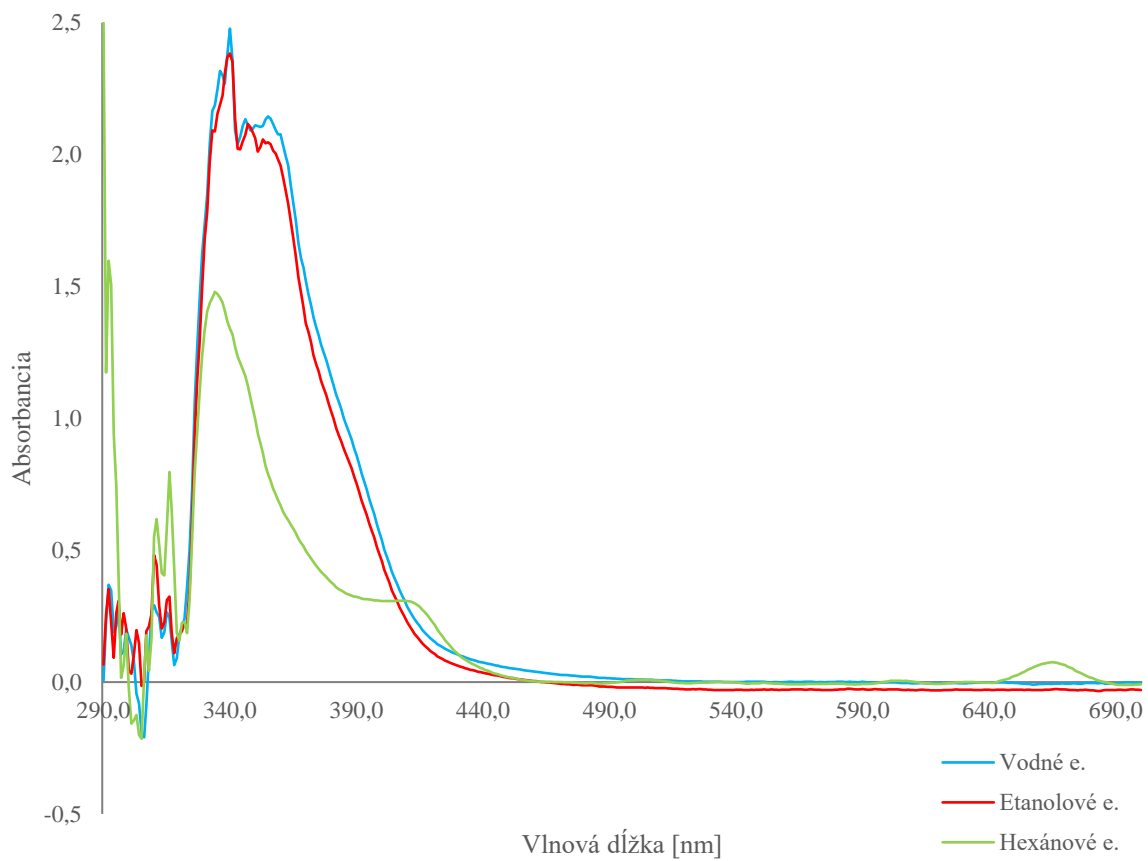
### 3. Kurkuma



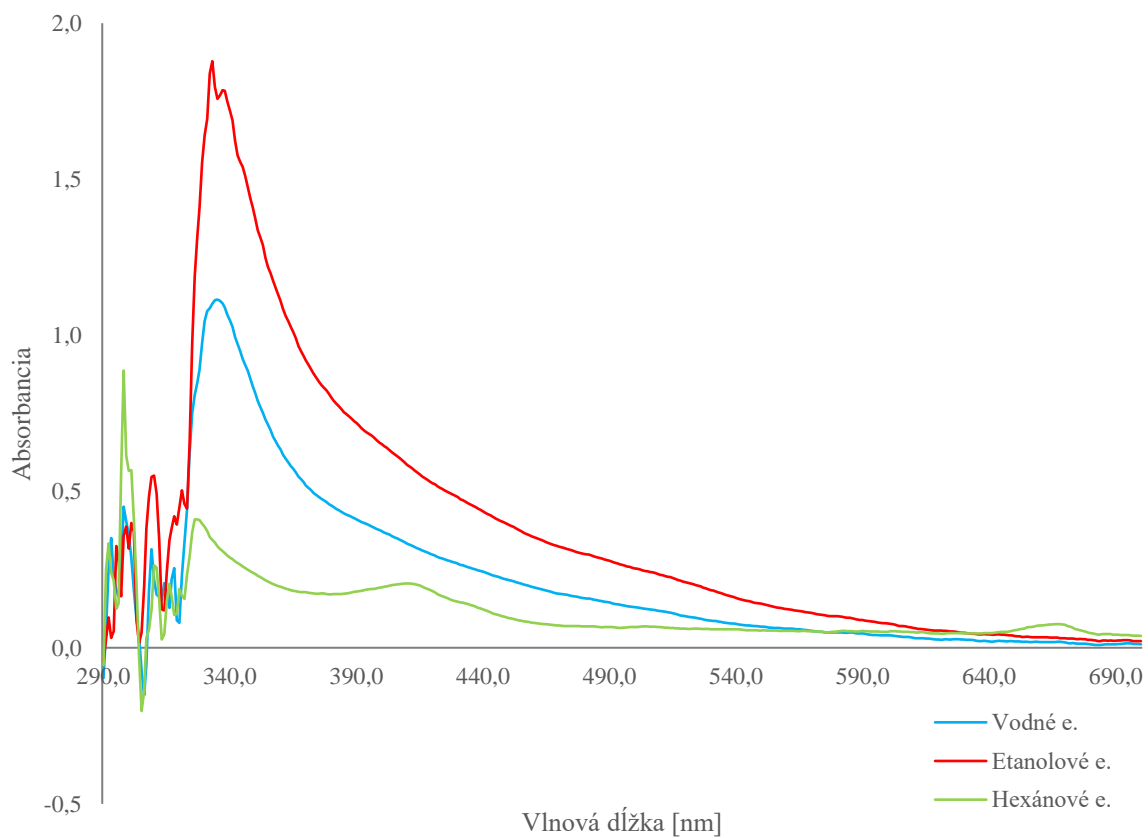
### 4. Mäta



### 5. Harmanček

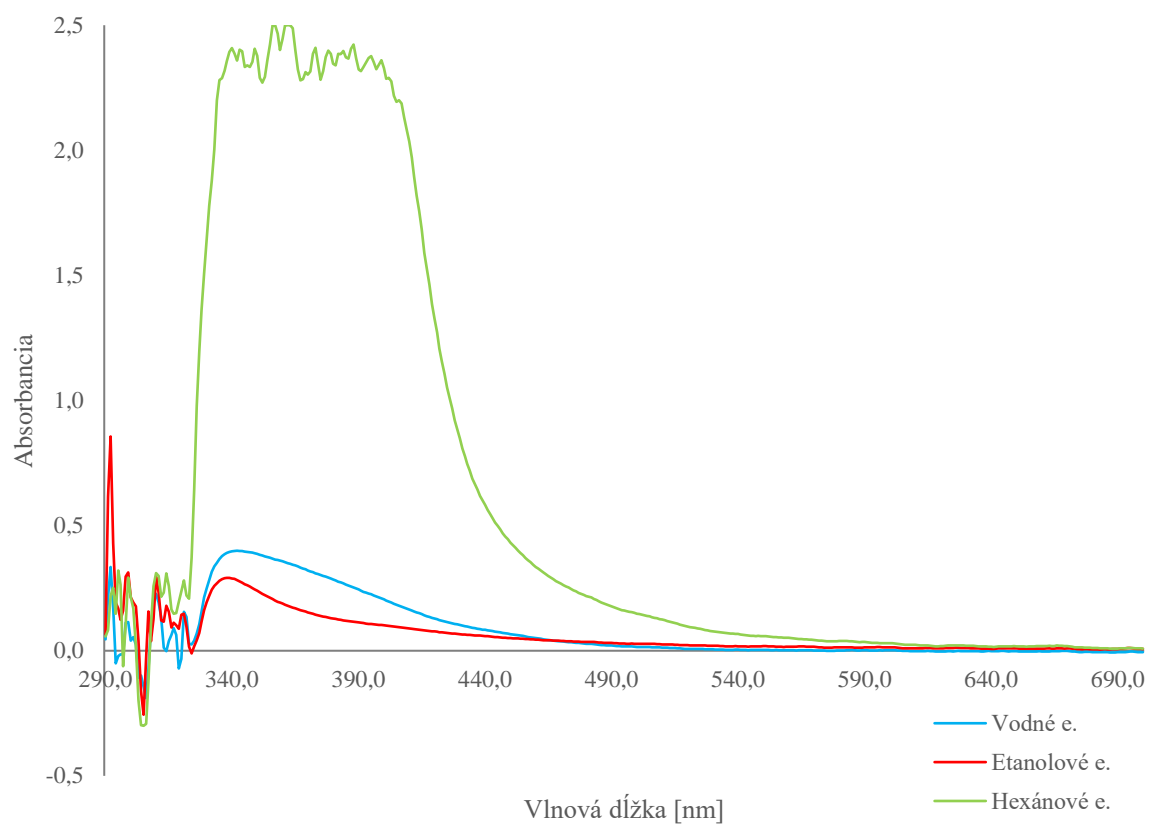


### 6. Škorica





### 7. Zázvor



### 8. Ľan

