

Dlhovekosť a mikrobióm

Cielená kombinácia prospešných baktérií *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501 a *Lactobacillus paracasei* IMC 502, extraktu z granátového jablka, polyfenolov, vitamínu B2 a D3.



I. KLINICKÁ ŠTÚDIA

- 6 mesačná
- randomizovaná
- dvojito zaslepená
- placebom kontrolovaná
- na súbore 97 seniorov

Konzumácia kmeňov *L. rhamnosus* IMC 501 a *L. paracasei* IMC 502 má priaznivý protizápalový účinok, a to prostredníctvom modulácie črevnej mikrobioty a následného zvýšenia produkcie SCFA (krátkoreťazcových mastných kyselín). Tieto kmene zároveň spomaľujú degradáciu črevnej mikrobioty spôsobenú vekom, čím prispievajú k zníženiu zápalu. Ich zaradenie do každodennej stravy starších dospelých môže teda predstavovať preventívnu stratégiu na podporu zdravého starnutia.

Cielená kombinácia prospešných baktérií *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501 a *Lactobacillus paracasei* IMC 502, extraktu z granátového jablka, polyfenolov, vitamínu B2 a D3.

Kombinácia probiotických baktérií *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501 a *Lactobacillus paracasei* IMC 502, extraktu z granátového jablka, polyfenolov, vitamínu B2 a D3 bola vybraná na základe ich vedecky preukázaných pozitívnych protizápalových vlastností, účinkov podporujúcich zdravšie a pomalšie starnutie a schopnosti ochrany pred civilizačnými ochoreniami.



ZÁPAL, STARNUTIE

A ČREVNÝ MIKROBIÓM

Globálna populácia starne rýchlejšie než kedykoľvek predtým (1), pričom priemerná dĺžka života pri narodení dosiahla v roku 2019 hodnotu 72,8 roka, čo predstavuje nárast o takmer 9 rokov oproti roku 1990 (2). Udržiavanie aktívneho životného štýlu v starobe bude v budúcnosti kľúčové, keďže viac ako 50 % chorobnosti dospelých na celom svete sa pripisuje ochoreniam súvisiacim s vekom (3).

Starnutie je spojené s chronickým, nízko stupňovým zápalom, ktorý predstavuje rizikový faktor pre rozvoj viacerých ochorení. Starnutie výrazne ovplyvňuje

črevnú homeostázu, stravovacie a životné návyky a spolu s fyziologickými zmenami súvisiacimi s vekom spôsobuje u starších dospelých dysbiózu črevnej mikrobioty. Táto dysbióza spolu so zápalom nízkeho stupňa môže prispievať k rozvoju ochorení a k zvyšujúcej sa krehkosti starších ľudí.

Na vyhodnotenie vplyvu vyváženej črevnej mikrobioty pri potlačení zápalových procesov spojených so starnutím sa uskutočnila randomizovaná dvojito zaslepená, placebom kontrolovaná štúdia, ktorej cieľom bolo posúdiť vplyv intervencie kombinácie probiotických kmeňov *L. rhamnosus* IMC 501 a *L. paracasei* IMC 502 na zdravé starnutie.

Metodika

Štúdia hodnotila účinok každodennej konzumácie probiotickej zmesi obsahujúcej 5×10^9 CFU *L. rhamnosus* IMC 501 a *L. paracasei* IMC 502 v pomere 1:1, podávanej formou obohatených potravín alebo výživového doplnku u zdravých seniorov.

Cieľom suplementácie bolo zlepšiť parametre súvisiace so starnutím, zápalom a celkovou pohodou účastníkov. Účastníci boli náhodne zaradení do jednej z dvoch paralelných skupín: jedna skupina dostávala probiotikami obohatené potraviny a kapsuly, druhá skupina dostávala zodpovedajúce placebo. Primárnym sledovaným ukazovateľom v štúdii bola plazmatická koncentrácia hsCRP (vysoko citlivého C-reaktívneho proteínu). Sekundárne ukazovatele zahŕňali monitorovanie vybraných skupín baktérií črevnej mikrobioty a hladín SCFA (krátkoreťazcových mastných kyselín) vo vzorkách stolice.

Výsledky

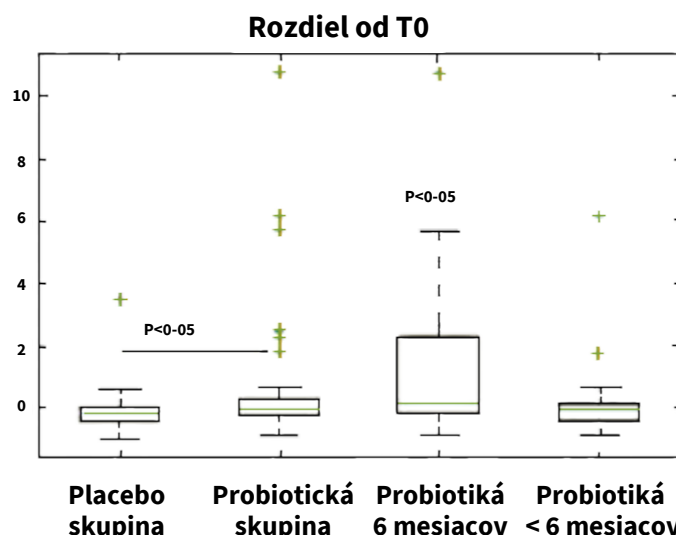
Hladina hsCRP

CRP hrá dôležitú úlohu v zápalových a chorobných procesoch a v reakciách hostiteľa na infekciu. Jeho normálne hladiny sa starnutím zvyšujú. Zistilo sa, že jeho zvýšené hladiny v sére sprevádzajú zvýšenú náchylnosť na ochorenia a úmrtnosť u starších pacientov, ako je zvýšené riziko sarkopénie, kardiovaskulárnych patológií, postihnutia a kognitív-

neho poklesu u jedincov nad 65 rokov (4).

Na porovnanie hladín hsCRP medzi placebo a probiotickou skupinou sa použil rozdiel medzi hodnotami pred (T0) a po (T1) suplementácií.

Hoci počet účastníkov v štúdii nebol vysoký, **pokles hladín hsCRP bol štatisticky významne väčší v probiotickej skupine v porovnaní s placebom** ($p < 0,05$), čo naznačuje, že probiotická suplementácia mala pozitívny vplyv na chronický nízkestupňový zápal. Pri porovnaní rôznych dĺžok podávania probiotík sa ukázalo, že **šestmesačná suplementácia mala významnejší účinok na zníženie hladiny hsCRP v porovnaní s kratším trvaním** ($p < 0,05$) (Obr. 1).



Obr. 1: Rozdielne hodnoty hladiny HsCRP medzi T0 a T1 súvisiace s dvoma experimentálnymi skupinami a časmi suplementácie probiotikami (upravené podľa Salvesi, C. a kol., 2022).

Monitorovanie vybraných bakteriálnych skupín

Profil črevnej mikrobioty bol skúmaný pred a po podávaní probiotík, aby sa monitorovali všetky zmeny, ktoré sa vyskytli, berúc do úvahy priemerné hodnoty skupín s placebom a probiotikami. V skupine s placebom neboli zaznamenané žiadne významné zmeny okrem štatisticky významného poklesu bifidobaktérií v T1. Hlavným zistením v skupine s probiotikami bol významný nárast *Lactobacillus spp.* Okrem toho v skupine s probiotikami dlhodobé podávanie pozitívne ovplyvnilo účinnosť samotnej suplementácie, čo

viedlo k významnému zlepšeniu počtu *Lactobacillus spp.* u 100 % subjektov, ktorí pokračovali v užívaní 6 mesiacov, v porovnaní so skupinou, ktorá užívala doplnky kratšie ako 6 mesiacov. Ďalej bol pozorovaný podiel ľudí so zvýšenou/zníženou koncentráciou bifidobakterií po intervencii. Najmä *Bifidobacterium spp.* sa zvýšilo u 76 % účastníkov v probiotickej skupine s priemerným 6,3-násobným pomerom. Opačný trend s klesajúcimi hodnotami sa pozoroval u 63 % účastníkov v placebovej skupine.

Analýza črevnej mikrobioty

Na charakterizáciu účinkov probiotickej suplementácie na črevnú mikrobiotu účastníkov boli sekvenované V3–V4 oblasti génov 16S rDNA pomocou sekvenačnej platformy Illumina MiSeq. Analyzovalo sa zloženie črevnej mikrobioty v probiotickej skupine v dvoch časových bodoch: pred intervenciou (T0) a po nej (T1).

Zloženie mikrobioty na úrovni kmeňov (phyla)

Porovnanie pred a po intervencii ukázalo významné zníženie Proteobacteria, ktoré sú spájané so zápalom a dysbiózou čriev a významný nárast Verrucomicrobia a Actinobacteria, čo naznačuje pozitívnu moduláciu mikrobioty.

Zmeny na úrovni rodov a čeľadí

V rámci Verrucomicrobia bol pozorovaný výrazný nárast Akkermansiaceae (čeľaď) a *Akkermansia spp.* (rod). V rámci Actinobacteria sa zvýšila hojnosť Bifidobacteriaceae (čeľaď) a *Bifidobacterium spp.* (rod). Predikciou funkčného profilu mikrobioty (Pomocou nástroja PICRUSt) sa odhadovali metabolické dráhy prítomné v črevnej mikrobiote na základe 16S sekvencií. Po probiotickej suplementácii sa preukázalo významné zvýšenie aktivity viacerých metabolických dráh, najmä v oblasti rozkladu aminov, aromatických zlúčenín a aminokyselín.

Charakterizácia profilu SCFA (krátkoreťazcových mastných kyselín)

Na začiatku štúdie sa zaznamenala veľká individuálna variabilita v hladinách SCFA medzi účastníkmi, ako aj medzi rôznymi skupinami a pohlaviami. Po ukončení suplementácie sa zistilo, že v probiotickej skupine došlo k výraznému, aj keď šta-

tisticky nevýznamnému nárastu celkových hladín SCFA v porovnaní s placebom. Pri porovnaní hodnôt pred a po intervencii (T0 vs T1) v rámci tej istej skupiny, sa v probiotickej skupine zistil štatisticky významný nárast celkových SCFA a kyseliny maslovej (butyrátu). Kyselina octová (acetát) bola najhojnejšou SCFA v oboch skupinách. Po intervencii sa v probiotickej skupine zaznamenal mierny, ale neštatisticky významný nárast jej hladiny. Hladiny ostatných SCFA zostali relatívne nezmenené a bez štatisticky významných rozdielov. Tento výsledok naznačuje, že **dlhodobá konzumácia probiotík môže podporovať tvorbu prospešných SCFA, najmä butyrátu, ktorý zohráva kľúčovú úlohu pri ochrane črevnej bariéry a znižovaní zápalu.**

II. KLINICKÁ ŠTÚDIA

- 6 mesačná
- randomizovaná
- dvojito zaslepená
- placebom kontrolovaná
- na súbore 97 seniorov

Dlhodobá suplementácia kmeňov *L. rhamnosus* IMC 501 a *L. paracasei* IMC 502 môže prispievať k udržaniu výživového stavu, fyzickej výkonnosti a svalovej funkcie u zdravých starších dospelých. Výsledky naznačujú, že modulácia črevnej mikrobioty môže byť efektívnou preventívnou stratégiou proti sarkopénii.

Metodika

Cieľom tejto štúdie bolo vyhodnotiť modulačné účinky probiotickej suplementácie na zápalové markery a nutričný stav seniorov. Účastníci boli náhodne zaradení do jednej z dvoch skupín. Intervenčná skupina dostávala zmes kmeňov *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501 a *Lactobacillus paracasei* IMC 502 v pomere 1:1, v dávke 5×10^9 CFU denne. Placebo skupina dostávala

identický produkt bez probiotík. Pred (T0) a po 6 mesačnej intervencii (T1) boli odobraté vzorky stolice, moču a krvi na stanovenie sérových cytokínov, biogénnych amínov a zápalových markerov. Okrem toho bol vykonaný dotazník *Mini Nutritional Assessment* (MNA) na zaznamenanie nutričného stavu.

Výsledky

Detekcia a kvantifikácia biogénnych amínov

Biogénne amíny (BA), boli nedávno identifikované ako diagnostické markery rôznych a závažných ochorení (5). Použitá metóda umožnila kvantifikáciu 11 biogénnych amínov (BA) v každej vzorke moču. V časových bodoch T0 a T1 výsledky ukázali veľkú medzi- a vnútroskupinovú variabilitu medzi účastníkmi, čo je očakávané pri biologickej matrixi ako moč. Celkové množstvo BA sa po probiotickej intervencii znížilo, zatiaľ čo v placebo skupine sa zvýšilo. V oboch prípadoch však zmeny neboli štatisticky významné. Vo všeobecnosti, okrem 2-fenyletylamínu, ktorý sa v probiotickej skupine zvýšil v T1, sme pozorovali klesajúci trend v koncentrácii BA v moči v probiotickej skupine na konci suplementácie. Významný pokles bol zaznamenaný pri histamíne. Úroveň dopamínu sa v probiotickej skupine znížila, zatiaľ čo hladiny serotonínu zostali takmer stabilné.

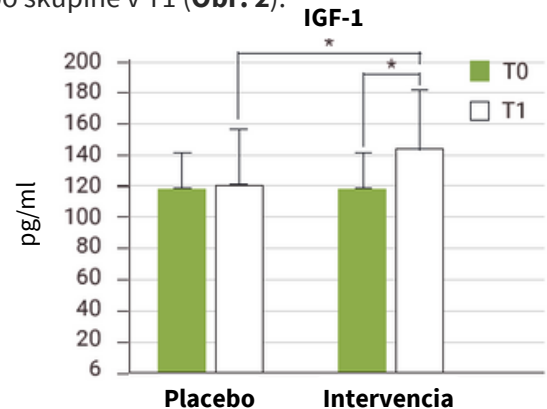
Hodnotenie TNF- α a IGF-1

TNF- α (*tumor necrosis factor alfa*) je prozápalový cytokín, t. j. molekula produkovaná imunitným systémom, ktorá podporuje zápal. S pribúdajúcim vekom jeho hladina narastá, čo prispieva k tzv. chronickému nízkošupňovému zápalu spojenému so starnutím (6).

V sére boli hladiny TNF- α vyššie ako normálne referenčné hodnoty (<20 pg/mL), pričom priemery prekročovali 50 pg/mL. Po suplementácii nastal významný pokles hladín TNF- α v probiotickej skupine.

IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*) je rastový faktor, podobný inzulínu, ktorý hrá kľúčovú úlohu v raste a regenerácii tkanív, najmä svalov. S vekom jeho produkcia prirodzene klesá, čo prispieva k sarkopénii (úbytku svalovej hmoty a sily) (7). Hladina

IGF-1 sa v probiotickej skupine v čase T1 významne zvýšila oproti východiskovej hodnote aj oproti placebo skupine v T1 (**Obr. 2**).



Obr. 2: Rozdielne hodnoty hladiny HsCRP medzi T0 a T1 súvisiace s dvoma experimentálnymi skupinami (upravené podľa Salvesi a kol., 2023).

Detekcia a kvantifikácia cytokínov

Profil cytokínov bol hodnotený v sére ako aj v stolici. V sére sa hodnotil pred a po suplementácii v oboch skupinách. Väčšina cytokínov nevykazovala po intervencii významné zmeny, s výnimkou IL-6, IL-8 a MIP-1 α , ktoré sa v probiotickej skupine po suplementácii významne znížili.

Výsledky cytokínov v stolici ukázali, že probiotická intervencia nemenila profil cytokínov v stolici ani v jednej zo skupín.

Hodnotenie nutričného stavu

Po 6-mesačnej intervencii došlo v probiotickej skupine k štatisticky významnému zlepšeniu rizika podvýživy: percento osôb v riziku podvýživy kleslo z 54,8 % na 35,7 % a percento osôb s normálnym výživovým stavom sa zvýšilo z 28,6 % na 57,1 %. Znížil sa aj počet podvyživených osôb.

Záver

Výsledky štúdií ukazujú, že dlhodobá suplementácia probiotickej zmesi *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501 a *Lactobacillus paracasei* IMC 502 dokáže **zmierniť zápalové procesy súvisiace so starnutím prostredníctvom modulácie zápalových a nutričných parametrov.**

POLYFENOLOVÁ OCHRANA PRED STARNUTÍM ORGANIZMU

Hoci WHO odporúča konzumáciu aspoň piatich porcií ovocia a zeleniny denne, tieto odporúčania dodržiava len malá časť populácie (8). V Európe

denne konzumuje odporúčané množstvo len približne 12 % obyvateľstva (9). Nízky príjem rastlinnej stravy je pritom spojený s vyšším výskytom chronických ochorení, zápalových procesov a zvýšenou mortalitou (10). Dôsledkom sú aj zrýchlené procesy biologického starnutia, ktoré sú úzko spojené s oxidačným stresom a poruchami vaskulárnej homeostázy (11).

Polyfenoly sú skupinou bioaktívnych zlúčenín prirodzene prítomných v rastlinných potravinách (12). Patria medzi najdôležitejšie antioxidanty v ľudskej výžive a zohrávajú kľúčovú úlohu v prevencii oxidačného stresu, zápalových procesov, neurodegeneratívnych a kardiometabolických ochorení (13). Ich biologická aktivita závisí od pravidelného a pestrého príjmu, keďže sa v tele neukladajú a rýchlo sa vylučujú (14).

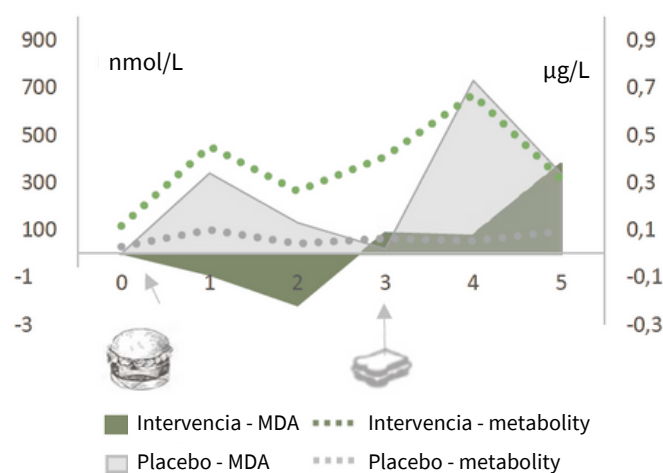
Klinické a observačné štúdie ukazujú, že vyšší príjem polyfenolov je asociovaný so zníženou hladinou zápalových biomarkerov, nižšou mierou lipidovej peroxidácie, napr. pokles malondialdehydu (MDA) a zlepšenou endotelovou funkciou (schopnosti endotelu regulovať činnosť ciev), čo môže mať významný vplyv na procesy súvisiace s dlhovekosťou a zachovaním funkčnej vitality (15).

Štandardizovaný komplex z ovocia a zeleniny, ktorý obsahuje viac ako 100 polyfenolových zlúčenín v jednej dávke poskytuje fyziologicky relevantnú 24-hodinovú fenolovú záťaž, napodobňujúcu účinok pestrej rastlinnej stravy počas dňa. Jeho kinetika absorpcie vykazuje trojfázový profil. Tento priebeh zabezpečuje kontinuálnu cirkuláciu fenolových metabolitov, čo vedie k rovnomernej antioxidačnej ochrane počas celého dňa a prispieva k udržiavaniu metabolickej homeostázy. Klinické dáta z dvojito zaslepanej, randomizovanej, placebom kontrolovanej štúdie ďalej preukázali, že po jednorazovej dávke extraktu došlo k **významnému zníženiu hladiny MDA** – presného biomarkeru lipidovej peroxidácie, t.j. poškodenia tukov – v postprandiálnom období, teda v období po konzumácii jedla (16). Práve toto obdobie je z hľadiska metabolického zdravia kritické, pretože po jedlách bohatých na tuky a sacharidy dochádza k

zvýšenej tvorbe reaktívnych foriem kyslíka (ROS), čo môže spustiť oxidačný stres a podporiť zápalové procesy (**Obr. 3**).

Účinnosť polyfenolov v tomto kontexte poukazuje na ich potenciál pri ochrane pred akútnymi metabolickými výkyvmi, ktoré sú dôležitým rizikovým faktorom kardiovaskulárnych a degeneratívnych ochorení spojených so starnutím. Zároveň bola pozorovaná inverzná korelácia medzi koncentráciou cirkulujúcich fenolových metabolitov a 24-hodinovou variabilitou priemerného arteriálneho tlaku (MAP), čo naznačuje pozitívny vplyv na vaskulárnu reguláciu. Stabilita krvného tlaku počas celého dňa je významným markerom zdravého cievneho systému a jedným z prediktorov dlhovekosti (17).

Tieto zistenia podporujú využitie komplexných rastlinných polyfenolov ako súčasti výživovej stratégie zameranej na zdravé starnutie a prevenciu chronických ochorení.



Obr. 3: Hladiny MDA v postprandiálnom období v intervenčnej a placebo skupine (upravené podľa Romain a kol., 2022).

UROLITÍNY A DLHOVEKOSŤ

Rastlinné zdroje ako granátové jablko (*Punica granatum*), vlašské orechy a maliny (*Rubus idaeus*) sú bohatým zdrojom elagitannínov – polyfenolických zlúčenín s preukázaným biologickým účinkom (18). Po perorálnom prijíme sú elagitanníny v gastrointestinálnom trakte hydrolyzované na kyselinu elagovú (EA), ktorá je následne metabolizovaná črevnou mikrobiotou na bioaktívne metabolity známe ako urolitíny, najmä urolitín A (UA)

urolitín B (UB) a izourolitín A (IsoUro-A). Urolitíny, najmä UA, majú potenciálny pozitívny vplyv na proces starnutia, predovšetkým prostredníctvom podpory bunkového zdravia. UA dokáže **zlepšiť mitochondriálnu funkciu stimuláciou génovej expresie** (zapína alebo zosilňuje činnosť určitých génov, ktoré riadia opravu a výkon mitochondrií) a **zvýšením autofágie** – teda prirodzeného procesu obnovy buniek, ktorý sa s vekom znižuje. Týmto spôsobom prispieva k efektívnejšiemu odstraňovaniu poškodených bunkových častí a podporuje regeneráciu buniek (19).

Ďalej bol u UA pozorovaný protizápalový účinok, a to najmä zníženie koncentrácií zápalových biomarkerov ako CRP, IL-1 β a TNF- α . Keďže chronický zápal predstavuje jednu z kľúčových charakteristík starnutia, modulácia týchto parametrov má vysoký klinický význam. Okrem toho UA preukázal pozitívny vplyv na svalovú funkciu, vrátane zlepšenia svalovej sily a vytrvalosti, najmä v oblasti dolných končatín. Tieto účinky majú potenciál prispieť k prevencii alebo spomaleniu progresie sarkopénie, čo je patologický stav spojený so stratou svalovej hmoty a zhoršením funkčnej kapacity u starších ľudí (20).

Farmakokinetické a metabolické vlastnosti extraktu z granátového jablka, štandardizovaného na obsah elagitanínov, konkrétne punikalagínov, boli skúmané v dvoch klinických štúdiách. V roku 2023 bola realizovaná randomizovaná štúdia s cieľom preskúmať metabolizmus hlavného polyfenolu punikalagínu a jeho črevných metabolitov – UA a UB. Subjekty dostali jednorazovú dávku 250 mg alebo 1000 mg extraktu, pričom plazmatické vzorky boli odoberané počas 48 hodín (21). Ďalšia otvorená štúdia na ľuďoch skúmala absorpciu, metabolizmus a antioxidačný účinok extraktu (22).

Výsledky

Absorbcia a antioxidačný účinok punikalagínu

Maximálna plazmatická koncentrácia (C_{max}) bola 33 ng/ml po 1 hodine (T_{max}) od podania. Následne sa pomocou HPLC-MS v plazme identifikovali metabolity ako urolitín A, urolitín B, hydroxy-urolitín A, urolitín A-glukuronid a dimetyl-glukuronid EA.

Okrem toho sa už 30 minút po konzumácii extraktu zaznamenal 32 % nárast antioxidačnej kapacity plazmy, čo poukazuje na rýchly nástup účinku a potenciálny antioxidačný prínos extraktu v ľudskom organizme.

Metabolizmus punikalagínu

Výsledky ukázali, že punikalagín sa po perorálnom podaní rýchlo metabolizoval na elagovú kyselinu, ktorá bola následne absorbovaná a konjugovaná. Konjugovaná forma elagovej kyseliny bola v plazme prítomná v koncentráciách 5- až 8-násobne vyšších ako voľná forma, bez ohľadu na podanú dávku. UA sa objavil v krvi s časovým odstupom, približne 8 hodín po podaní, čo podporuje hypotézu o jeho črevnom pôvode sprostredkovanom mikrobiotou.

Záver

Vzhľadom na narastajúci záujem o úlohu črevného mikrobiómu pri bioaktivácii elagitanínov na UA, ako aj ich súvis s pozitívnymi účinkami na zdravie, tieto výsledky poskytujú dôkazy o funkčnej aktivite polyfenolov obsiahnutých v štandardizovanom extrakte z granátového jablka.

Referencie

- (1) Salvesi, C.; et al. Impact of a probiotic diet on well-being of healthy senior: THE PROBIOSNIOR PROJECT. *Journal of Applied Microbiology*. 2022; 133(5), 2941-2953.
- (2) Salvesi, C.; et al. Six-Month Synbio® Administration Affects Nutritional and Inflammatory Parameters of Older Adults Included in the PROBIOSNIOR Project. *Microorganisms*. 2023; 11.3: 801.
- (3) Biagi, E.; et al. Gut microbiota and extreme longevity. *Current Biology*. 2016; 26.11: 1480-1485.
- (4) Velissaris, D.; et al. C-reactive protein and frailty in the elderly: a literature review. *Journal of Clinical Medicine Research*. 2017; 9(6), 461-465.
- (5) Gosetti, F.; et al. Simultaneous determination of sixteen underivatized biogenic amines in human urine by HPLC-MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 2013; 405, 907-916.
- (6) Chung, H.Y.; et al. Redefining Chronic Inflammation in Aging and Age-Related Diseases: Proposal of the Senoinflammation Concept. *Aging Dis.* 2019; 10, 367.
- (7) Dai, Z.; et al. IGF-1/IGF expression, regulation and biological function in different tissues. *Growth Horm. IGF Res.* 2010; 20, 275-281.
- (8) WHO. Increasing fruit and vegetable consumption to reduce the risk of noncommunicable diseases. World Health Organization, 2014.
- (9) Eurostat. Fruit and vegetable consumption statistics, 2019.
- (10) Aune D.; et al. Fruit and vegetable intake and the risk of cardiovascular disease, total cancer and all-cause mortality – a systematic review and dose-response meta-analysis. *Int J Epidemiol.* 2017; 46(3):1029-1056.
- (11) López-Otin C.; et al. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013; 153(6):1194-1217.
- (12) Manach C.; et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004; 79(5):727-747.
- (13) Vauzour D.; et al. Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanisms of action. *Nutrients*. 2010; 2(11):1106-1131.
- (14) Cardona, F.; et al. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2013; 24(8), 1415-1422.
- (15) Dominguez, L. J.; et al. Impact of Mediterranean diet on chronic non-communicable diseases and longevity. *Nutrients*. 2021; 13(6), 2028.
- (16) Romain, C.; et al. Exposure to (Poly) phenol metabolites after a fruit and vegetable supplement intake: a double-blind, cross-over, randomized trial. *Nutrients*. 2022; 14(22), 4913.
- (17) Benetos A.; et al. Blood pressure variability and aging: methodological and clinical aspects. *Hypertension*. 2005; 45(4):575-581.
- (18) Cerdá, B.; et al. The potent in vitro antioxidant ellagitannins from pomegranate juice are metabolised into bioavailable but poor antioxidant hydroxy-6H-dibenzopyran-6-one derivatives by the colonic microflora of healthy humans. *European journal of nutrition*. 2004; 43(4), 205-220.
- (19) Grevendonk, L.; et al. Impact of aging and exercise on skeletal muscle mitochondrial capacity, energy metabolism, and physical function. *Nature communications*. 2021; 12(1), 4773.
- (20) Singh, A.; et al. Urolithin A improves muscle strength, exercise performance, and biomarkers of mitochondrial health in a randomized trial in middle-aged adults. *Cell Reports Medicine*. 2022; 3(5).
- (21) Wang, Y.H.; et al. Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for characterizing pomegranate extract pharmacokinetics in humans. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2023.
- (22) Mertens-Talcott SU; et al. Absorption, metabolism, and antioxidant effects of pomegranate (Punica granatum L) polyphenols after ingestion of a standardised extract in healthy human volunteers. *J Agric Food Chem.* 2006. 54(23): 8956-8961.