

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



Metabolismus stilbenoidů v modelu tlustého střeva

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Ondřej Veselý

Obor studia: Výživa a potraviny

Vedoucí práce: Mgr. Petr Maršík Ph.D.

© 2017 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Metabolismus stilbenoidů v modelu tlustého střeva" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 13. 4. 2017

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval Mgr. Petru Maršíkovi Ph. D. za spolupráci v problematice diplomové práce a v jeho důvěru v mé schopnosti. Velký dík patří českému systému školství, díky kterému jsem nemusel platit školné a bez jehož podpory bych studium stěží zvládl. Chtěl bych poděkovat každému, kdo si najde čas a přečte si i kdyby jen část této práce, protože jejímu sepsání jsem věnoval značné úsilí, a i přesto s ní nebudu nikdy úplně spokojený. Dle mého úsudku by mohla posloužit dalším studentům k čerpání validních informací pro jejich prezentace či hledání odpovědí, a pokud by se takový bludný čtenář se zájmem k tématu skutečně našel a měl otázky, může mě kontaktovat na adrese czeveselyo@gmail.com, kde mu rád odpovím na všechny jeho dotazy.

Metabolismus stilbenoidů v modelu tlustého střeva

Souhrn

Stilbenoidy jsou běžnou součástí rostlinné stravy konzumované lidmi po celém světě. Jsou to látky náležící do skupiny fenolů, které mají pro lidské zdraví účinky profylaxe. Nacházejí se například v plodech vinné révy, ale i v kořenech a kůře dalších rostlin. Jsou jim připisovány protizánětlivé, antioxidantní, antibakteriální a další účinky. Tyto účinky mohou být modulovány po průchodu trávicím traktem působením bakteriálních kolonií.

Cílem práce bylo zjistit, jaké metabolity mohou působením střevní mikrobioty v modelu tlustého střeva vznikat z 8 stilbenoidních látek a navrhnout případné aspiranty pro další klinické využití. Metodou LC-MS v negativním módu bylo charakterizováno na základě MS spekter 19 metabolitů vzorků stilbenoidů. Žádné monocyklické sloučeniny nebyly detekovány. Nejvíce metabolitů vzniklo z resveratrolu a batatasinu. Nejintenzivněji vznikal dihydrostilben z trans-resveratrolu. Hlavními reakcemi probíhající v modelu byly dehydroxylace jedné hydroxylové vazby v poloze meta, demethylace, oxidace dvojné vazby a její případná ztráta.

Hypotézou bylo, že střevní mikrobiota bude štěpit tyto bicyklické sloučeniny na oxidované monocyklické sloučeniny, protože většina reakcí probíhajících ve střevech je silně katabolická. Tato hypotéza se nepotvrdila, protože všechny metabolity byly bicyklické.

Klíčová slova: resveratrol, batatasin III, střevní metabolismus, mikrobiální degradace, LC-MS, polyfenoly, stilbenoidy

Metabolism of stilbenoids in a colon model

Summary

Stilbenoids are common part of the vegetable diet consumed by people around the world. These substances belong to the group of phenols, which have the effects of prophylaxis in human health. Stilbenoids can be found for example in fruits of the vine, but also in the roots and bark of other plants. These effects can modulate after stilbenoids pass through the digestive tract, by the action of bacterial colonies.

The aim of the study was to determine which metabolites can be generated from 8 stilbenoids by the actions of intestinal microflora in the gut model and to propose potential aspirants for additional clinical usage. Based on the MS spectras there were characterized 19 metabolites from 8 stilbenoids using LC-MS in negative mode. None monocyclic compounds were detected. Most of the metabolites formed from the trans-resveratrol and batatasine. Dihydrostilben was the most intensely originated metabolite from trans-resveratrol. The main reactions, taking place in the model, were dehydroxylation of one hydroxyl bonds in the meta position, demethylation, oxidation of the double bond and a its potential loss.

The hypothesis was that the intestinal microbiota will cleave these bicyclic compounds to oxidised monocyclic compounds, because most of the reactions taking place in the intestines is strongly catabolic. This hypothesis was not confirmed because all metabolites were bicyclic.

Keywords: resveratrol, batatasine III, intestinal metabolism, microbial degradation, LC-MS, polyphenols, stilbenoids

Obsah

1	Úvod	1
2	Cíl práce a hypotéza	2
2.1	Cíl práce	2
2.2	Hypotéza	2
3	Literární přehled	3
3.1	Sekundární metabolity	3
3.1.1	Balastní látky	3
3.1.1.1	Vláknina	5
3.1.1.2	Retrogradní škrob	6
3.1.2	Fenolické látky	7
3.1.2.1	Lignany	9
3.1.2.2	Fenolové kyseliny	9
3.1.2.3	Flavonoidy	11
3.1.2.4	Prenylované flavonoidy	11
3.1.2.5	Stilbenoidy	12
3.2	Trávicí soustava	14
3.2.1	Ústa (cavitas oris)	17
3.2.2	Jícen (esophagus)	18
3.2.3	Žaludek (gaster)	18
3.2.4	Tenké střevo (intestinum tenue)	19
3.2.4.1	Mikrobiom tenkého střeva	19
3.2.5	Tlusté střevo (intestinum crassum)	19
3.2.5.1	Mikrobiom tlustého střeva	19
3.2.6	Stolice (feces)	20
3.3	Biotransformace látek	21
3.3.1	Metabolismus balastních látek	21
3.3.2	Metabolismus fenolických látek	22
3.3.3	Metabolismus stilbenoidních látek	23
3.4	Zánět	24
3.4.1	Fyziologický zánět	24
3.4.2	Cyklooxygenázy	25
3.4.3	Eikosanoidy	26
3.5	Metody purifikace a měření polyfenolů	29

3.5.1	Metoda LLE.....	30
3.5.2	Metoda MAE.....	30
3.5.3	Metoda UAE.....	30
3.5.4	Metoda SFE.....	30
3.5.5	Metoda PLE.....	31
3.5.6	Metoda SPE.....	31
3.6	Chromatografie.....	31
3.6.1	TLC.....	31
3.6.2	GC.....	32
3.6.3	HPLC.....	32
3.6.3.1	HPLC-MS.....	33
4	Materiál a Metody.....	35
4.1	Materiál.....	35
4.1.1	Chemikálie.....	35
4.1.1.1	Chemikálie pro extrakci-inkubaci.....	35
4.1.1.2	Chemikálie určené pro purifikaci.....	35
4.1.1.3	Chemikálie použité při měření.....	35
4.1.2	Přístroje.....	36
4.2	Experiment.....	36
4.2.1	Fermentace vzorků.....	36
4.2.2	Čistění vzorků.....	37
4.2.3	Měření vzorků.....	38
5	Výsledky.....	40
5.1	Výsledky stanovené UPLC-Q-TOF a DataAnalysis.....	40
5.2	Grafické výstupy software DataAnalysis 4.3.	41
5.3	Semikvantitativní analýza.....	45
5.3.1	Batatasin III.....	45
5.3.2	Oxyresveratrol.....	47
5.3.3	Pinostilben.....	48
5.3.4	Thunalben.....	49
5.3.5	Piceatannol-3-O-glukosid.....	50
5.3.6	Piceatannol.....	52
5.3.7	Resveratrol.....	54
6	Diskuze.....	59
7	Závěr.....	63
8	Použitá literatura.....	64
9	Seznam zkratk.....	72

1 Úvod

S vědeckým pokrokem se zlepšuje a leckdy i umožňuje provést empirické ověřování různých hypotéz, jejichž základy vzešly z prostého pozorování.

Lidské zdraví a jeho udržitelnost je značně ovlivněné způsobem života každého jedince, ale i environmentálně. Pokroky medicíny a blahobyt přinesly lidstvu markantní změny v době dožití, kdy průměrný věk dožití českých mužů se za posledních 140 let navýšil o více než 40 let, ale zároveň poskytly rodnou půdu pro projevení se mnoha nemocí, které v minulosti měly spíše raritní charakter, a nyní je dáváme do souvislosti s civilizačními onemocněními.

Protože lidské zdraví je dáno rovnováhou vnitřního prostředí, může být narušení této homeostáze přechodné a život neohrožující, s kterým si tělo poradí samo, ale i dlouhodobé a letální, které vyžaduje nekonvenční přístupy.

Na stravu se již nenahlíží pouze jako na palivo potřebné pro fungování těla, ale i jako na způsob, jak lze zredukovat výskyt a projevy civilizačních onemocnění. Tyto vlastnosti nejsou dány jen poměrem různých živin, které tělo vyžaduje pro zajištění správného fungování, ale i řadou látek nenutritivního charakteru, jakými jsou polyfenoly, resp. stilbenoidy, které dokáží imitovat funkční látky v těle a tím navozovat farmakologické účinky.

Protože stilbenoidy patří mezi látky s aromatickým kruhem, tělo je není samo o sobě schopné přirozeně syntetizovat. Takové látky si pak uchovávají vlastní formu stability. Bakterie a další prokaryota tyto látky ovšem transformují do struktur, které disponují dalšími vlastnostmi.

Protože lidské tělo je plné bakterií, a protože látky jimi vytvořené jsou schopné ovlivnit fungování lidského těla, otvírá se zde potenciál pro nalezení farmakologicky účinných látek, které by mohly v budoucnosti být použity k léčbě, resp. prevenci civilizačních a dalších zásadních onemocnění.

Lidské střevo je zaplněné prokaryotními kolonisty, které stilbenoidy metabolizují. Pokud by se je podařilo kultivovat, udržet na živu a nakrmit je těmito látkami odděleně od dalších interferujících látek, mohli bychom následně detekovat a analyzovat jejich metabolity a z nich přejít k navrhnutí již k farmakologicky významnému experimentu. A tímto se zabývá tato práce.

2 Cíl práce a hypotéza

2.1 Cíl práce

Cílem práce je zjistit střevní metabolismus stilbenoidů s potenciální protizánětlivou aktivitou jako kandidátů na další klinické využití.

2.2 Hypotéza

Hypotézou je, že díky katabolickému charakteru většiny procesů probíhajících v trávicím traktu budou převažujícími finálními metabolity stilbenoidů zejména oxidované monocyklické aromatické sloučeniny.

3 Literární přehled

3.1 Sekundární metabolity

Jedná se o látky běžně se vyskytující v rostlinách s vlastnostmi biologicky aktivních sloučenin nevýživového charakteru, s nimiž se lidský organismus setkává denně (Namdeo, 2007). Nyní je u více než 5 000 těchto látek jednoznačně prokázán biologický účinek (Opletal, 2016). Jsou to molekuly s různorodou struktur. Řadíme mezi ně flavonoidy, terpenoidy, lignany, polyfenoly, kumariny, saponiny, steroly, ftalidy, sulfidy. Disponují antiagregačními, antihyperlipidemickými, protirakovinými, imunomodulačními, protizánětlivými a digestivními účinky (Puttaraju, Venkateshaiah et al., 2006, Vaquero, Alberto et al., 2007, Edreva, Velikova et al., 2008, Palacios, Lozano et al., 2011).

Na téma sekundárních metabolitů rostlin bylo za posledních 20 let publikováno v impaktované literatuře více než 3 000 studií ročně, z toho více než 120 monografií. Tyto látky jsou běžně používané ve formě nutraceutika. Jako nutraceutika tak nacházejí uplatnění metabolity vycházející z 2-methyl-buta-1,3-dienových jednotek (monoterpeny, diterpeny, triterpeny, tetraterpeny, hemiterpeny, seskviterpeny, iridoidy a sekoroiridoidy), metabolity vycházející z šikimátu-fenolové sloučeniny (fenolkarboxylové kyseliny, kumariny, kumestany, lignany, flavonolignany, stilbenoidy, diarylheptanoidy, deriváty flavanu, třísloviny, naftochinony, a naftodianthrony) a látky z metabolismu aminokyselin (alkaloidy, betalainy, glukosinoláty, sírné sloučeniny) (Opletal, 2016).

3.1.1 Balastní látky

Definovat balastní látky ztěžuje rozdílný pohled chemiků oproti pohledu kliniků a vědeckých pracovníků zabývajících se výživou. Na základě striktně chemického hlediska označujeme za balastní látky neškrobové polysacharidy a lignin. Tato definice ovšem nezahrnuje škrob rezistentní proti natrávení lidským enzymatickým systémem. Z hlediska biologického lze na balastní látky nahlížet jako na polyhydroxy sloučeniny, které se v tenkém střevě (*intestinum tenue*) nemetabolizují, a proto projdou až do tlustého střeva (*intestinum crassum*) (Kasper and Burghardt, 2015).

Roztřídění balastních látek z pohledu chemického je nemožné, nicméně na základě biologických kritérií a svých funkcí v rostlinách je Kasper and Burghardt (2015) třídí na tři skupiny:

- 1----> Vláknina zajišťující pevnost rostlinné struktury
- 2----> Rostlinné pryskyřice, hleny a gumy
- 3----> Zásobní polysacharidy

Mezi takovéto látky řadíme celulózu, hemicelulózu, pektin, arabinoxylany, mucilagy, galacto-oligosacharidy, polyfruktózu, arabinogalaktany, pryskyřice, oligofruktany, inulin, agar, karagenan, tragant, lignin a mnoho dalších. Další třídění lze provést na základě rozpustnosti ve vodě. Protože mnoho balastních látek má z části vláknitou strukturu, přistoupilo se k pojmenování skupiny jako vláknina, rostlinná vlákna, potravinová vlákna či anglické „dietery fibers“. Z uvedeného třídění zároveň vyplývá, že ne všechny balastní látky mají nezbytně vláknitou strukturu. Proto by se neměla výše zmíněná označení používat (Kasper and Burghardt, 2015).

Za výživových podmínek běžných pro západní společnost se do tlustého střeva denně dostane 20-60 g balastních látek (Cummings and Englyst, 1991), nicméně individuální rozdíly jsou značné. Příkladem části populace v Německu byl příjem menší než 15 g (Kasper, Rabast et al., 1980). Zdroje pro Anglii uvádí průměrně 20g pro běžnou populaci, 40g pro vegetariáni (Kasper and Burghardt, 2015)).

Doporučený denní příjem balastních látek dle referenčních hodnot pro příjem živin Německa-Rakouska-Švýcarska (D-A-CH) je přímo úměrný dennímu příjmu energie z potravy (Společnost, 2011). Přibližně 30 g/den, což odpovídá 12,5 g/1 000 kcal pro ženu a 10 g/1 000 kcal pro muže. American Health Foundation doporučuje pro děti od 3 let do 20 let dle výpočtu: věk + 5 (g) (Williams, Bollella et al., 1995).

3.1.1.1 Vlákna

V 60. letech minulého století upozornili angličtí lékaři pracující v Africe a v Indii na snížený výskyt mnoha onemocnění, které jsou pro západní společnost typické (Hunt, 1963). Nověji na tento paradox (nižší nutriční vzdělání, nižší životní úroveň a nižší výskyt nemocí) upozornili Burkitt, Painter a Trowell, lékaři pracující ve východní Africe a pro výklad výše uvedených rozdílů incidencí vytvořili fiber-hypothesis, podle které konzumace balastních látek chrání před vznikem civilizačních onemocnění, jež jsou typické pro západní společnost. Trowell (1976) mluví o vlivu na 4 významné onemocnění:

- **Onemocnění trávicího ústrojí**
- **Onemocnění metabolismu a cévního systému**
- **Onemocnění endokrinních žláz**
- **Autoimunitní onemocnění**

Kauzalita byla potvrzena po přechodu na tzv. západní formu výživy u Afričanů, Indů atd. (Burkitt, 1973).

Toto protektivní působení balastních látek se vysvětluje dvěma, respektive třemi hlavními mechanismy pro balastní látky vlastní.

Jelikož látky nejsou destruovány lidským enzymatickým systémem, dostávají se až do tlustého střeva. Zde probíhá jejich bakteriální dekompozice (fermentace), při které se degraduje až 100 % ve vodě rozpustných balastních látek. Jejich stravitelnost ukazuje tab. 1.

Tab. 1: Stravitelnost střevními bakteriemi dle Pilch et al., (1987) a Woods and Gorbach (2001)

Balastní látky	Fermentace (%)
Celulóza	20-80
Hemicelulóza	60-90
Pektiny	100
Guarová guma	100
Ispaghula	55
Rezistentní škrob	100
Inulin, oligosacharidy	100 (nenadměrný příjem)
Lignin	0

Bakterie z těchto látek utvářejí metabolity, které popisuje tabulka číslo 2.

Tab. 2: Fermentační rovnice dle Kasper and Burghardt (2015)

34,5 mmol hexózy* -->	48 mmol	mastné kyseliny s krátkým řetězcem	kyselina octová
			kyselina
	11 mmol		propionová
	5 mmol		kyselina máselná
	23.75 mmol	produkty enzymatické destrukce	Metan
	34.25 mmol		Sacharidy
10.50 mmol	Voda		

*180 mg balastních látek (zde zjednodušeně hexóz) = 1 mmol

3.1.1.2 Retrográdní škrob

V minulosti se předpokládalo, že 100 % α -glukanů (přesněji škrobu) se hydrolyzuje účinkem střevní diastázy (α -amylázy) a kvantitativně se přemění na glukózu, která se posléze kompletně využije (Kasper and Burghardt, 2015). Nicméně později se podařilo zjistit, že přibližně 10 % škrobu ze smíšené stravy je rezistentní proti natrávení α -amylázou, což vede k jejímu postupu do distální části trávicí soustavy, přesněji do tlustého střeva (Englyst and Cummings, 1985).

Tomuto jevu se říká fyziologická malabsorpce škrobu. Tato odolnost oproti enzymatickému natrávení je dána specifickými konformacemi molekul škrobu (Kasper and Burghardt, 2015).

Englyst, Wiggins et al. (1982) rozlišují 3 formy rezistentního škrobu.

-RS1---- Kontakt amylázy a škrobu znesnadňuje značná velikost škrobové částice, tj. závisí na způsobu zpracování potraviny a intenzitě žvýkání

-RS2---- Krystalinická struktura u škrobových zrn ztěžuje enzymatickou destrukci (škrob z tepelně nezpracovaných brambor a zelených brambor se téměř nedestruuje)

-RS3---- Amylóza i amylopektin při náhlém zchlazení po předchozím zahřátí mohou rekrystalizovat, a tak se stát pro amylázu nedostupnými

Tato definice byla v pozdějších letech rozšířena (Lattimer and Haub, 2010)

-RS1---- Se skládá ze škrobových granulí obklopených nestravitelnou rostlinnou maticí

-RS2---- Se vyskytuje v přirozené formě, jako v tepelně neupravených bramborách a v kukuřici

-RS3---- Krystalizující škroby jsou vyrobené směsicí vaření a chlazení

-RS4---- Je škrob chemicky modifikovaný zesílením, esterifikací nebo transglykosylací a není přírodní

3.1.2 Fenolické látky

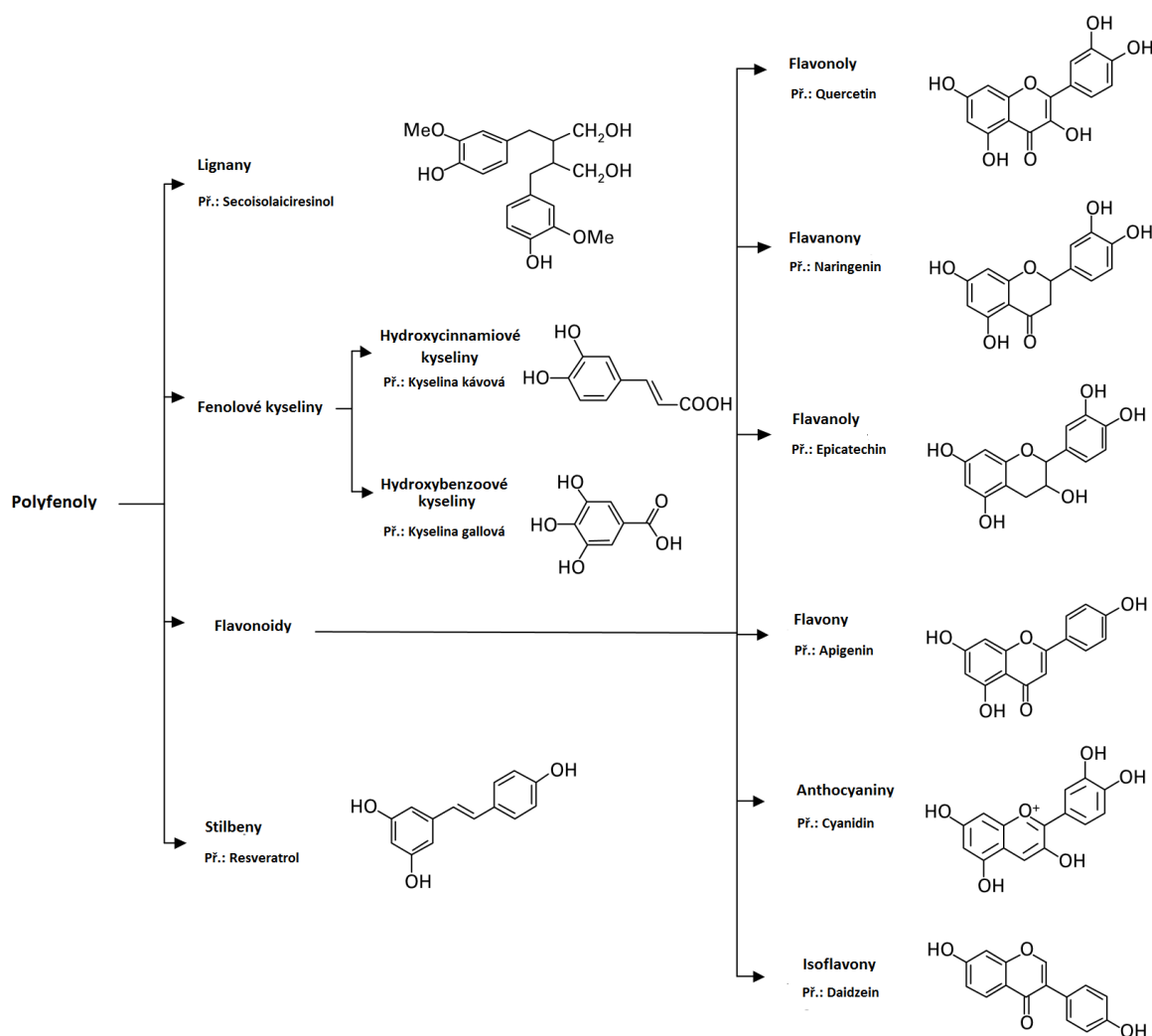
Pod pojmem fenoly označujeme látky obsažené v rostlinách, jejichž molekuly obsahují fenolovou strukturu. Jedno z příkladných rozdělení ukazuje obrázek 1.

Jeden ze způsobů dělení je členění na fytoestrogeny, flavonoidy a fenolické kyseliny. Fytoestrogeny lze rozdělit do tří podskupin, a to na izoflavonoidy, lignany a kumestany. Izoflavonoidy, někdy označované jako izoflavony, se vyskytují téměř výhradně v sojových bobech, v rostlinách jsou zastoupeny málo (Kaufman, Duke et al., 1997). Protože molekulární struktura fytoestrogenů disponuje aktivními místy obdobných u estrogenů, mohou se vázat na jejich receptory. Je nutné dodat, že hormonální aktivita je o několik řádů nižší v porovnání s živočišnými estrogeny, což snižuje jejich účinnost, a tak jejich koncentrace oproti endogennímu hormonu může být v krevním řečišti mnohonásobně vyšší (Miksicek, 1993, Schmitt, Lehmann et al., 2002).

Lignany jsou výchozí skupinou látek pro syntézu ligninu (polymer fenylopropanu s Mh mezi 1 000–4 500 Da se schopností vázat žlučové kyseliny). Střevní mikrobiota je schopna tyto látky přeměnit na tzv. „savčí lignin“, mezi které patří enterolakton (Yoder, Lancaster et al., 2014). Ten je absorbován střevní sliznicí, v játrech konjuguje s kyselinou glukuronovou a nakonec je vyloučen močí. Přirozeně se hojně vyskytuje ve lněném semínku (800 mg/kg), v dalších rostlinných zdrojích potravy se koncentrace o 2-3 řády liší (Kasper and Burghardt, 2015).

Fenolické kyseliny jsou skupinou hydroxybenzoových a hydroxycinnamových kyselin hojně se vyskytující v rostlinách. Patří sem kyselina kávová, gallová, kumarová, vanilová a další. Dobrým zdrojem těchto látek je zelí, otruby a ořechy. Nacházejí se převážně v povrchových vrstvách ovoce (Opletal, 2016).

Obr. 1: Dělení polyfenolů (Spencer, Abd El Mohsen et al., 2008)



3.1.2.1 Lignany

Jedná se o širokou skupinu sekundárních metabolitů cévnatých rostlin s nízkomolekulární hmotností, jež vytváří převážně třída nižších dvouděložných rostlin, a taky někteří zástupci v oddělení pravých hub (Landete, 2012). Jsou vytvářeny oxidativní konjugací acyl-C₃ jednotek přes β-atom postranního řetězce (Ward, 1982).

Nyní je známo více než 300 lignanů vyskytujících se v 70 čeledích rostlin a hub, obzvláště v čeledích *Asteraceae*, *Berberidaceae* a *Linaceae*. (Opletal, 2016). Vyskytují se v nich ve formě aglykonů i glykosidů. Protože aglykony jsou ve vodném prostředí obtížně rozpustné, jsou v gastrointestinálním traktu metabolisovány. Vzniklé metabolity mají antioxidační, antivirovou, antineoplastickou a další biologickou aktivitu (Adlercreutz, Höckerstedt et al., 1987, MacRae, Hudson et al., 1989, Zhang, Li et al., 2007).

Někdy se do skupiny lignanů *sensu lato* zařazují i další přírodní látky, které lignany připomínají tak, že na molekulu tvořenou fenylypropanovou strukturou se váže další přírodní látka. Mezi takové binární molekuly patří lignan-iridoidy, kumarino-lignany a flavono-lignany (Yamamoto, Nitta et al., 1993, Isaza, Ito et al., 2001, Yun, Lee et al., 2001).

Pod důležité zdroje lze zařadit antikancerogenní arktiin z *Articum lappa* (Ming, Guns et al., 2004), hydroxymatairesinol se silnou antioxidační aktivitou získaný ze smrku ztepilého *Picea abies* (Saarinen, Warri et al., 2000), silymarin z Ostropestřce mariánského *Silybum marianum* (Huseini, Larijani et al., 2006). Lignany získané konzumací lněných semínek (sekoisolariciresinol, matairesinol) jsou v důsledku střevního metabolismu přeměněny na enterodiol a posléze enterolakton. Tyto savčí metabolity s duálními hormonálními vlastnostmi (mají schopnost působit jako estrogen a anti-estrogen) se v rostlinách přirozeně nevyskytují (Gagnon, Côrtes et al., 2009).

Za nutriční dávkou se uvažuje 40-140 mg lignanů denně pro čisté lignany nebo 20-40 g lněných semínek konzumovaných ve dvou dávkách. Tepelné opracování snižuje obsah těchto látek přibližně o 50 % a konzumace celých lněných semínek doprovází velmi nízká biologická dostupnost (Opletal, 2016).

3.1.2.2 Fenolové kyseliny

Někdy označované jako fenolkarboxylové kyseliny jsou výchozí substancí pro vznik složitějších polyfenolických látek, tedy látek vycházejících z šikimátu, a jedná se o volné či jako deriváty vázané hydroxybenzoové a hydroxyskořicové kyseliny (Wang, Liu et al., 2011). Tyto látky tvoří estery s jinými kyselinami, alkoholy či sacharidy, glykosidy

dekarboxylovaných kyselin a acylované flavonoidy (Opletal, 2016). Významnými zástupci vycházející z hydroxybenzoové kyseliny jsou kyselina salicylová, gallová, vanilová, syringová. Hydroxyskořicové kyseliny reprezentují kyselina kávová, ferulová, kumarová, sinapová (Wang, Liu et al., 2011).

Kromě nutraceuticky nepříliš žádoucí kyseliny gallové se ostatní fenolové kyseliny vyskytují ve větších množstvích (0.2 % a více) v rostlinách pouze výjimečně (Opletal, 2016). Jejich zastoupení vyjadřované jako distribuční koeficient klesá s množstvím hydroxylových skupin, opačně po etherifikaci methylem výskyt narůstá. Distribuční rozdělení běžně se vyskytujících fenolových kyselin zobrazuje tabulka číslo 3.

Tab. 3: Distribuční dělení běžných fenolových kyselin v rostlinách převzaté z Opletal (2016)

Hydroxybenzoové kyseliny		
Substituce	Název kyseliny	K _D
2-OH	Salicylová	186.21
4-OH	4-hydroxybenzoová	28.18
2,5-diOH	Gentisová	15.14
3,4-diOH	Protokatechová	6.46
3,4,5-triOH	Gallová	2.95
4-OH, 3-OMe	Vanilová	22.39
3-OH, 4-OMe	Isovanilová	12.02
4-OH, 3,5-diOMe	Syringová	8.92
Hydroxyskořicové kyseliny		
Substituce	Název kyseliny	K _D
2-OH	o-kumarová	34.67
4-OH	p-kumarová	34.67
3,4-diOH	Kávová	14.13
4-OH, 3-OMe	Ferulová	26.30
3-OH, 4-OMe	Isoferulová	26.30
4-OH, 3,5-diOMe	Sinapová	19.50

3.1.2.3 Flavonoidy

Flavonoidy, někdy mylně označované jako vitamin P (Balch and Balch, 1997), jsou větší částí skupiny polyfenolů, jež bylo popsáno více než 8 000 (Pietta, 2000). Přirozeně se vyskytují v rostlinách, v čerstvém jídle z rostlin připravených (Liu, Hu et al., 2004, Spencer, Abd El Mohsen et al., 2008) a nápojů z nich připravených (Ishige, Schubert et al., 2001).

Flavonoidy prvotně vzbudily zájem pro jejich antioxidační účinky, jež se projevovaly snížením, případně zpomalením přirozené degradace potravin (hnutí a žluknutí), které ovlivňují trvanlivost potravin (Ross, 2014). Výzkum zaměřený na další účinky přímo ovlivňující zdraví zahájil roku 1992 Renaud poté, co publikoval epidemiologická data porovnávající konzumaci vína, nasycených mastných kyselin a zdraví populace, jež dnes známe pod pojmem „Francouzský paradox“ (Renaud and de Lorgeril, 1992). Přestože byl protektivní účinek připisován resveratrolu (Kopp, 1998), byla tato hypotéza v pozdějších letech vyvrácena, protože se prostou konzumací vína nedostane farmakologicky účinné dávky resveratrolu (tj. by bylo potřeba konzumovat denně více než 100 litrů vína). Později se začal tento jev přisuzovat jiným faktorům, mezi které patří hlavně celkově vyšší konzumace zeleniny (Ferrières, 2004) nebo menší a častější porce (Rozin, Kabnick et al., 2003).

Protože flavonoidů jsou tisíce a vyskytují se v různém poměru i množství v rostlinné stravě, je detailní popsání jejich účinku na zdraví stěží možné. Nicméně o jejich protektivním vlivu neexistují dnes pochyby. Mezi prokázané působení můžeme zmínit protizánětlivé účinky, zhášení volných radikálů, inhibici hydrolytických a oxidativních enzymů (Le Marchand, 2002, Kim, Seguin et al., 2008).

3.1.2.4 Prenylované flavonoidy

Tyto látky se řadí mezi typické sekundární metabolity rostlin. Člení se do několika kategorií, přičemž za společný jmenovatel považujeme fenolický hydroxyl na skeletu rozdílného biosyntetického původu substituovaném prenylovanou skupinou: Flavonoidy, chalkony, xanthyony, stilbeny, kumariny, chinony, ftalidy, aromatické organické kyseliny a acylfluoroglucinoly (Chen, Mukwaya et al., 2014, Šmejkal, 2014). Biologická aktivita látek je dána charakterem skeletu a modifikací prenylem. Výskyt těchto látek je úzce vázán na taxonomický řád. Tyto látky se hojně vyskytují v čeledi *Paulowniaceae*, *Leguminosae*, *Guttiferae*, *Rutaceae*, *Cannabaceae*, *Moraceae* (Zuurbier, Fung et al., 1998, Šmejkal, Chudík et al., 2008, Lukaseder, Vajrodaya et al., 2009, Zelová, Hanáková et al., 2014). Chemicky může

být postranní řetězec modifikován cyklizací, methylací a oxidací, ale i adicí voda-hydroxyl, substitucí či tvorbou karbonylu. Nejběžnější způsob připojení je 3-methyl-2butenyl, 3-methyl-3butenyl, 3-methyl-1-butenyl a cyklizací se sousedním hydroxylem za vzniku 2,2-dimethylpyranu nebo furanu (Opletal, 2016). Díky prenylaci jsou látky více lipofilní, což usnadňuje penetraci do buňky přes lipofilní vrstvy, absorpci přes kožní bariéru či prostupnost z trávicího traktu do krevního řečiště (Šmejkal, 2014). Prenylované flavonoidy mají nejčastěji popisované antibakteriální, cytotoxické a protizánětlivé účinky (Chen, Mukwaya et al., 2014).

Významným zástupcem prenylovaných sloučenin je xanthohumol, který byl poprvé izolován na počátku 20. století (Verzele, Stockx et al., 1957), získáván z chmele otáčivého *Humulus lupulus*, v jehož hlávkách se v závislosti na odrůdě, období, ročníku a agrotechnických podmínkách vyskytuje v množství 0,2-1,1 % (Karabín and Hudcová, 2012). Přestože jeho hlavním zdrojem v lidské výživě je pivo, jeho příjem je hluboko pod farmakologicky účinnou dávkou, jak prokazuje výzkum, množství xanthohumolu nacházející se v pivu pohybuje mezi 0,01 a 0,03 mg/l a isoxanthohumolu 0,5 až 3,4 mg/l (Stevens, Taylor et al., 1999). Pro farmakologické účinky je zapotřebí přijmout po přepočtu ze zvířecích testů 180 mg/denně, což nelze docílit prostou konzumací piva (Legette, Ma et al., 2012).

Ikariin patří mezi prenylované flavonolové glykosidy. Jeho zdrojem je kupříkladu nařezáček *Epimedium brevicornum* (přibližně 0,3 %) jež doprovází jeho demethylovaný analog epimedisid A. Jedná se o významný imunostimulant, který indukuje tvorbu interleukinů IL-2, IL-3 a IL-6, zvyšuje buněčnou aktivitu NK (natural killers) buněk, zvyšuje fagocytární aktivitu myších makrofágů. Je pokládán za netoxický a bezpečný prostředek. Nutraceutická dávka se pohybuje mezi 15-30 mg/den (Opletal, 2016).

3.1.2.5 Stilbenoidy

Tyto látky se zpravidla vyskytují ve vyšších rostlinách. Vznikají z fenylypropanové jednotky a tvoří monomerní až trimerní formy. Hlavním zástupcem vyskytujícím se ve formě aglykonu nebo glykosidu ve více než 100 rostlinách je fytoalexin (E)-resveratrol (3.5.4'-trihydroxystilben). Je často doprovázen látkami strukturně podobnými, jakými jsou piceatannol, piceid a pterostilben (Chachay, Kirkpatrick et al., 2011, Opletal, 2016). V červeném víně lze nalézt cis a trans formu v přibližném poměru 1:2 ve prospěch farmakologicky účinnější trans formy. Kromě vína lze resveratrol nalézt i v několika dalších zdrojích, jako vinné révě, červeném grepu nebo luštěninách (Soleas, Diamandis et al., 1997).

Je znám přímý vliv šedé plísně *Botrytis cinerea* na obsah resveratrolu (Adrian, Jeandet et al., 1997). Jeho množství ovlivňuje odrůda, klima, technologie zpracování a environmentalní stres (Langcake and Pryce, 1976, Langcake, Cornford et al., 1979, Opletal, 2016). Při získávání stilbenů s vysokým podílem resveratrolu se musí zvolit takový postup, aby se v případě použití kořene křídlatky japonské *Reynoutria japonicae* extrahovaly nežádoucí antrachinony (emodin, fycion, chrysofanol, kvestin a další) v minimálním množství. Protože tyto nežádoucí antrachinony exokarp vinné révy neobsahuje, je použití vinných hroznů pro extrakci resveratrolu nutričně upřednostňováno (Opletal, 2016).

Resveratrol se rychle vstřebává v konjugované formě z colon v první hodině po perorální aplikaci (Kuhnle, Spencer et al., 2000), obdobně i v testech na zvířatech (Juan, Buenafuente et al., 2002, Baur, Pearson et al., 2006). V krevní plazmě se vyskytuje ve formě sulfátu a glukuronidu a do jednoho dne se vyloučí přibližně čtvrtina přijatého množství (Yu, Shin et al., 2002). Po čase se glukuronidovaný metabolit navrátí zpět do původní formy (Forester and Waterhouse, 2009). Jeho účinky jsou podobné dalším fytoestrogenům. Váže se na oba typy estrogenních receptorů s afinitou přibližně 7000krát menší v porovnání s lidskými estrogény (Opletal, 2016). Tento mechanismus je spojován s tlumením mutagenese, inhibicí enzymů cyklooxygenáz a s trombocytární agregací (Szewczuk, Forti et al., 2004, Baur and Sinclair, 2006, Zykova, Zhu et al., 2008). Má antioxidantní, protizánětlivé, protirakovinné a kardioprotektivní účinky (Jang, Cai et al., 1997, Frémont, 2000, Hung, Chen et al., 2000), snižuje aktivitu prozánětlivých cytokinů (Wadsworth and Koop, 1999, Culpitt, Rogers et al., 2003) inhibuje replikaci viru *Herpes simplex* (Docherty, Fu et al., 1999) a CYP450 v hepatocytech (Chachay, Kirkpatrick et al., 2011, Catalgol, Batirel et al., 2012). U animálních testů se prokázal vliv na délku života (Baur, Pearson et al., 2006). Je zkoumán vliv stilbenoidních látek na enzymatický systém cyklooxygenáz (Kutil et al., 2014, Kutil et al., 2015).

Za nutraceutickou dávkou se považuje 15-45 mg resveratrolu denně ve dvou dávkách (Opletal, 2016), obvykle v 99% čistotě trans formy extrahované z rhizomu křídlatky japonské *Polygonum cuspidatum* (Chachay, Kirkpatrick et al., 2011).

3.2 Trávicí soustava

Trávicí soustava je spojená trubice složená z několika na sebe navazujících úseků, jejichž hlavním úkolem je digesce poživatiny. Na tom se podílí jak mechanické, tak chemické trávení. Hlavní trávicí enzymy shrnuje tabulka číslo 4.

Tab. 4: Trávení makroživin enzymatickým systémem, dle Holecek (2016)

	Zdroj enzymů	Enzym	Produkt (účinek)
Lipidy	Ebnerovy žlázy	Slinná lipáza	1,2-diacylglyceroly
	Žaludek	Žaludeční lipáza	Butyrát
	Pankreas	Pankreatická lipáza	FA, 2-monoacylglyceroly
		Fosfolipáza A2	FA, lyzofosfatidylcholin, glycerol-3-P, cholin
		Cholesterolesteráza	Cholesterol, FA
	Kolipáza	Nezbytná pro účinek lipázy	
Bílkoviny	Žaludek	Pepsin	Endopeptidáza
		Rennin	Kasein->parakasein
	Pankreas	Trypsin	Endopeptidáza
		Chymotrypsin	Endopeptidáza
		Karboxypeptidáza	Exopeptidáza
		Elastáza	Endopeptidáza
	Enterocyty	Aminopeptidázy	Exopeptidáza
		Dipeptidázy	Dipeptid-> 2AA
Sacharidy	Ústa	Ptyalin	
	Pankreas	Ptyalin	
	glykokalyx enterocytů	Maltáza	Glukoza+glukoza
		Laktáza	Glukoza+galaktoza
		Sacharóza	glukoza+fruktóza

Nejen obsah, nýbrž i sliznice gastrointestinálního traktu (GIT) jsou osídleny mikroby od dutiny ústní (*cavitas oris*) až po *anus* (Bibby and Van Kesteren, 1940, Holzapfel, Haberer et al., 1998). Mikrobiota se značně liší v různých úsecích tohoto GIT nejen kvantitativně, ale i kvalitativně (Holzapfel, Haberer et al., 1998). Významným faktorem je složení potravy, které ovlivňuje vzájemné poměry kvantitativního složení jednotlivých druhů, obzvláště pro tlusté střevo (Louis, Scott et al., 2007). Důležitou roli zde hrají kupříkladu ve vodě rozpustné balastní látky, jejichž produkty bakteriální fermentace čili degradace mají řadu profylaktických

vlastností. Například složení bioty může být ovlivněno živými organismy přijatými potravou (bakterie mléčného kvašení). Výživa determinuje složení mikrobiálního osídlení trávicího traktu velice silně (Cani, Bibiloni et al., 2008). Nejvýznamnější bakterie vyskytující se v trávicím traktu jsou uvedeny v tabulce číslo 5.

Tab. 5: Lokalizace bakterií v lidském trávicím systému, dle Holzapfel, Haberer et al. (1998)

Orgán a počet kolonií	Organismus
Žaludek a duodenum 10 ¹ -10 ³ KTJ/ml	<i>Lactobacillus</i>
	<i>Enterococcus</i>
	Kvasinky
Jejunum a ileum 10 ⁴ -10 ⁸ KTJ/ml	<i>Lactobacillus</i>
	<i>Enterobacteriaceae</i>
	<i>Enterococcus</i>
	<i>Bacteroides</i>
	<i>Bifidobacterium</i>
Tlusté střevo 10 ¹⁰ -10 ¹² KTJ/ml	<i>Fusobacterium</i>
	<i>Eubacterium</i>
	<i>Bacteroides</i>
	<i>Bifidobacterium</i>
	<i>Enterococcus</i>
	<i>Fusobacterium</i>
	<i>Lactobacillus</i>
	<i>Enterobacteriaceae</i>
	<i>Clostridium</i>
	<i>Veillonella</i>
	<i>Proteus</i>
	<i>Staphylococcus</i>
	Kvasinky
Prvoci	

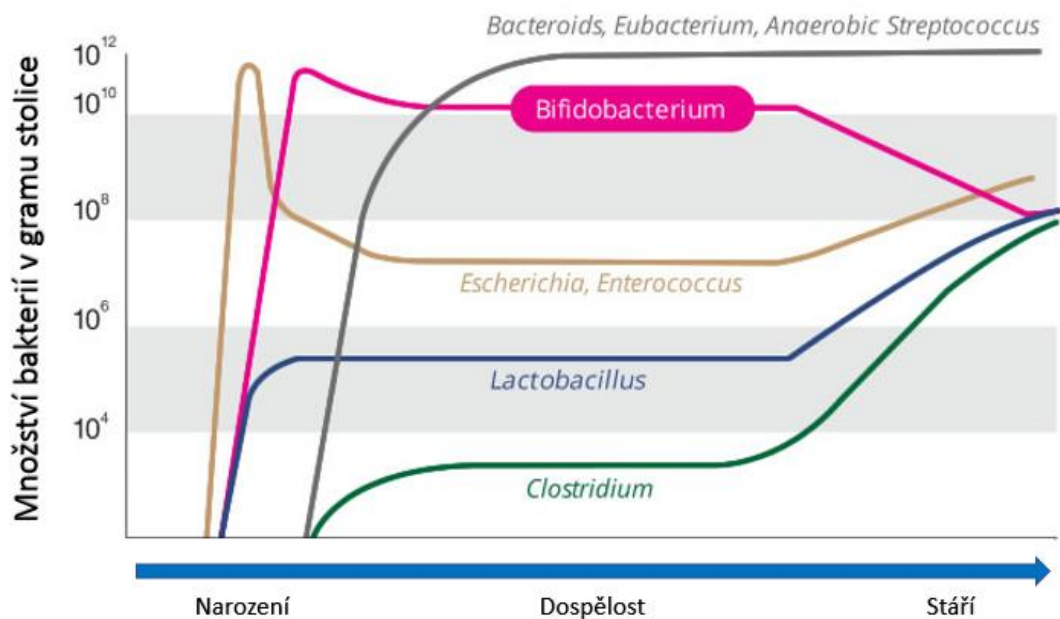
Střeva novorozence jsou při porodu zcela prosté bakterií. Osídlení začíná v průběhu porodu z porodních cest a pokračuje náhodnými mikroby, jejichž kvalita je determinována prostředím (Bronský, 2010). Mezi 7. a 10. dnem se vyvine osídlení bifidobakteriemi (až 99 % celkové mikrobioty) z mateřského mléka, které obsahuje celou řadu bifidogenních látek (oligosacharidy, glykoproteiny aj.), jež jsou obligátní pro převažující kolonizaci těmito druhy.

Při krmení kojeneckou výživou připravenou z kravského mléka se vyvíjí poněkud odlišné kolonie, bifidobakterie, *Bacteroides*, *Enterobacteriaceae* a streptokoky (Kasper and Burghardt, 2015).

Kolonie bifidobakterií, vyvolají pokles pH do kyselé oblasti, čímž silně omezí průvodní mikrobiom (Rugg-Gunn, Roberts et al., 1985, Liepke, Adermann et al., 2002). Oproti laktobacilům syntetizujících výhradně kyselinu mléčnou, vytvářejí bifidobakterie navíc kyselinu octovou. Tato kombinace (osídlení bifidobakteriemi a nízké pH prostředí už v důsledku přítomnosti kyseliny octové) poskytuje významnou ochranu před patogenními mikroby, jež by se mohly ve střevě pomnožit, protože kyselinová bariera žaludku není ještě optimální, a tak by mohla translokací vyvolat celkovou infekci.

Rozdíly osídlení trávicího traktu mezi kojenci se stírají po zavedení kašovitě stravy, tedy okolo 3. měsíce (Kasper and Burghardt, 2015). Po nevyhnutelnému přechodu na smíšenou stravu se biom začne více podobat osídlení traktů dospělých. S věkem se intestinální složení může změnit. Tak mají starší lidé méně bifidobakterií na úkor *Clostridium perfringens* (Mitsuoka and Hayakawa, 1973). Změny probíhající v důsledku stárnutí ukazuje obrázek 2.

Obr. 2: Probíhající změny ve střevní biotě v průběhu stárnutí, dle Mitsuoka and Hayakawa (1973)



V proximální části trávicího ústrojí je nalačno počet mikrobů v žaludeční a duodenální šňávě nízký ($10^2 - 10^3$ mikrobů/ml) a převážně odpovídá spektru v dutině ústní a jícnu (Hao and Lee, 2004). Příjem potravy ovlivní osídlení bakterií a kvasinek kvantitativně v průběhu první a druhé hodiny o 2 až 4 řády více (je-li přítomna hypacidita, resp. anacidita, vzroste počet dokonce na 10^6-10^7 mikrobů/ml) (Kasper and Burghardt, 2015).

Protože prohloubení znalosti výživy a lidského mikrobiomu umožňuje profylaktické působení, jsou v dnešní době běžně k dostání produkty obsahující kvalitativně i kvantitativně předem definované kolonie bakterií v produktech všeobecně nazývaných jako probiotika. Již na začátku 20. století bakteriolog Mečnikov přisoudil pozitivní vliv fermentovaných mléčných produktů bakteriím mléčného kvašení a roku 1908 obdržel za tento výzkum Nobelovu cenu (Nobelprize, 1908). Mezi probiotické druhy patří rody *Lactobacillus* *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. preuterii*, *L. rhamnosus* a z rodu *Bifidobacterium* *B.adolescens*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve* (Kasper and Burghardt, 2015). Pro úspěšné profylaktické účinky musí probiotika při podání per orální cestou projít kyselým žaludkem a proximálním oddílem tenkého střeva. Terapeutické vlastnosti těchto prokaryotických organismů spočívají ve třech bodech: Modifikují mikrobiom a tím i prostředí ve střevním lumenu, optimalizují složení hlenového povlaku a funkci epitelu (tedy i bariérovou funkci střevní sliznice) a konečně moduluji GALT (gut-associated lymphoid tissues-imunitní systém sdružený s intestinálním traktem), kam patří Peyeroovy plaky a lymfatická tkáň v apendixu (Perdigon, Galdeano et al., 2002).

Při podání širokospektrálních antibiotik dochází k dočasnému signifikantnímu posunu složení mikrobiomu doprovázející gastrointestinální potíže. Za časté průjemy a břišní obtíže je odpovědné rozmnožení *Clostridium difficile*, vzácněji se může vyvinout osídlení *Candida albicans* (Kasper and Burghardt, 2015).

3.2.1 Ústa (cavitas oris)

Ústní dutina je první částí trávicí soustavy a dochází v ní k trávení mechanickému i chemickému. Mechanické zajišťuje zubní aparát a jazyk, na chemickém se z části podílí jak enzymy produkované lidskými buňkami, tak z části i prokaryota. V dutině ústní lze tak nalézt bakterie aerobní i anaerobní, kvasinky, vláknité houby, viry a prvoky (Slezák, Dřížhal et al., 1997)

Její stav ovlivňují faktory jako strava, věk, léčiva, pohlaví, genetické predispozice a další. Při narození jsou ústa prostá bakterií, ale postupně se za pomoci třeba porodních cest

začnou zaplňovat různými druhy bakterií, jmenovitě *Streptococcus salivarius*, *Lactobacillus acidophilus* a *Streptococcus mitis*.

Mikrobiom dutiny ústní rozlišujeme na rezidentní (*Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Veilonella*, *Peptococcus*, *Staphylococcus*, *Fusobacterium*, *Bacteroides* a aktinomycety) a transientní (Sutter, 1984).

3.2.2 Jícen (esophagus)

Jícen je čistě transportní orgán. Soustředěný svalový tonus v distální části jícnu uzavírá spodní úsek proti žaludku, což zabraňuje regurgitaci žaludečního obsahu. Tento tonus je při spolknutí potravy uvolněn, čímž je umožněna pasáž do další části trávicího ústrojí. Je zajímavostí, že nejen množství, nýbrž i složení konzumované stravy jak u zdravého, tak nemocného člověka, ovlivňuje gastroezofagický reflux. Motilitu jícnu ovlivňuje i pH a teplota stravy, a to tak, že se sníženým pH se zesiluje peristaltika, naopak se snížením teploty se motilita jícnu snižuje, což vede k prodloužení jícnové clearance. Častými poruchami jícnu jsou achalázie, akutní spasmus jícnu, divertikl jícnu, dysfagie, ezofagitida, karcinom jícnu (Kasper and Burghardt, 2015).

3.2.3 Žaludek (gaster)

Žaludek je trávicí orgán, jež má za úkol nahromadit konzumovanou potravu, natrávit a postupně uvolňovat do duodena (Ross, 2014). Trávení zajišťuje proteolytický enzym pepsin s optimálním pH 1,5-2 a kyselina chlorovodíková. Žaludek zároveň vytváří vnitřního castleův faktor (pozn.: vnější castleův faktor je vitamin B₁₂) (Cooper and Castle, 1960). Protože do duodena vstupuje chymus (trávenina) v malých dávkách, dostatečně rychle probíhá neutralizace kyseliny chlorovodíkové v důsledku smísením s pankreatickým sekretem a žlučí.

Setrvání chymu v žaludku závisí na rozličných faktorech, jako je zdraví jedince, podíl tuků v potravě, velikosti částic, konzistenci a osmotickém tlaku chymu. Žaludek vytváří enzymy trávicí bílkoviny a v menší míře i tuky (Ross, 2014). Přestože neprodukuje α -amylasu štěpící sacharidy, ta ještě působí v žaludku tak dlouho, dokud po zahájení sekrece kyseliny chlorovodíkové a po smíšení kašovité stravy s kyselým žaludečním obsahem hodnota pH nepoklesne do kyselé oblasti. Jak dokazuje (Patek and Post, 1941), po konzumaci jídla vysoce bohatého na bílkoviny se optimálního pH pro účinek pepsinu dosáhne po více jak 3 hodinách anebo vůbec, zatímco pH vyhovující alfa-amylase (optimum 6,7 (Holeček, 2016)) je v žaludku

ještě 30 minut po jídle. Při normální stravě pH po jídle výjimečně dosahuje pH větší než 3 (Crook, 1983).

3.2.4 Tenké střevo (*intestinum tenue*)

Jeho hlavním úkolem je resorpce živin. Na tom se významně podílejí Kerkringovy řasy a střevní klky, které ve srovnání s trubicí s hladkým vnitřním povrchem zvyšují resorpční plochu 600násobně (Ross, 2014). Dále střevní stěna zabraňuje vstupu imunogenních makromolekul a do lumen střeva se vylučují enzymy, jež dodávají tenkému střevu i přívlastek funkce trávicí. Pokud enzymy nestráví živiny, ty postupně projdou do tlustého střeva, kde proběhne u většiny z nich bakteriální destrukce. Většina živin je resorbována v *duodenu* a v *jejunu* (Kasper and Burghardt, 2015).

3.2.4.1 Mikrobiom tenkého střeva

V případě proximální části tenkého střeva (*duodenum*, *jejunum*) je mikrobiální osídlení nízké, pohybující se v počtu 10^4 mikrobů/ml a méně. Nízké počty se vysvětlují přítomností baktericidní žluči a pankreatické šťávy (Marteau, Minekus et al., 1997).

V *ileu* osídlení stoupá na počet 10^6 mikrobů/ml a zároveň přibývá anaerobních druhů. Mikrobiom tenkého střeva je poměrně stabilní, může být dočasně ovlivněn po konzumaci fermentovaných potravin (Kasper and Burghardt, 2015).

3.2.5 Tlusté střevo (*intestinum crassum*)

Hlavní funkcí tlustého střeva je absorpce vody, minerálů a vylučování odpadů jako vláknina, nestrávených živin a bakterií (Rolfes, Pinna et al., 2014)

3.2.5.1 Mikrobiom tlustého střeva

Distální část GITu je více než osídlena velkým množstvím bakterií (400-500 druhů) s dominancí anaerobů. Vzájemný kvalitativní poměr bakterií se s postupujícím věkem mění (Mitsuoka and Hayakawa, 1973).

Pro správné fungování tlustého střeva je důležité zajistit funkční ekosystém, jež v lumen střeva zajišťuje několik faktorů. Nezbytné je bakteriální osídlení hlenu pokrývajícího sliznici, odkud bakterie přestupují do střevního obsahu. V důsledku plného pokrytí mají bakterie přijaté potravou pouze malou příležitost uchytit se mezi povrchovou biotou (Hao and Lee, 2004).

Druhým významným faktorem jsou mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA) vznikající z bakteriální dekompozice sacharidů, přesněji balastních látek a retrográdního škrobu. Zvýšená nabídka těchto kyselin snižuje lumenální pH, v důsledku čehož se tlumí adheze převážně patogenních mikrobů (Hood and Zoitola, 1988). Svou roli mají i baktericidní, resp. bakteriostatické látky syntetizované rezidentní mikrobiotou a i stimulace imunobiologických obranných mechanismů ve střevní stěně (Kasper and Burghardt, 2015).

3.2.6 Stolice (feces)

Množství vyloučené stolice se pohybuje okolo 150-200 g denně, maximálně 300 g, ale je značně variabilní na základě způsobu stravování. Asi 70 % hmoty tvoří voda, velký podíl suché substance tvoří bakterie (10-15 %), podíl anaerobů proti aerobům činní asi 1000:1 (Kasper and Burghardt, 2015).

První stolice novorozence se nazývá smolka nebo meconium a později se lidská stolice dělí na 7 typů dle „Bristol stool“ stupnice, někdy nazývané jako Meyerova škála (Lewis and Heaton, 1997). Zdravý člověk denně vyloučí stolicí až 7 g tuků a 2 g dusíku (Kasper and Burghardt, 2015), ale tato čísla mohou být značně variabilní. Průměrný člověk dle dalšího zdroje denně vyloučí 128 g stolice o pH přibližně 6.6. Čerstvá stolice obsahuje okolo 75 % vody a 84-93 % organických zbytků, jež obsahují 25-54 % bakteriální hmoty, 2-25 % dusíkatých látek, 25 % sacharidů a nestrávených rostlinných zbytků a 2-15 % tuků (Rose, Parker et al., 2015).

S vylučováním stolice a trávením potravy je úzce spojena tvorba plynů a příslušná flatulence. Za normální frekvenci flatů denně se považuje průměrně 1 flatus na hodinu. Samotné vyloučené množství plynů je ovšem silně variabilní, tj. 500 až 2 000 ml. Tento markantní rozdíl je vysvětlován rozdílným složením mikrobioty (Kasper and Burghardt, 2015). Vliv na složení stolice má bezesporu zdravotní stav jedince, jeho váha a dieta (Rose, Parker et al., 2015).

Ze stolice je rovněž odhadován celkový počet bakterií v gastrointestinálním traktu. Hao and Lee (2004) předpokládali, že se běžně ve střevech vyskytuje 400 druhů a poddruhů o celkovém množství 10^{13-14} . Trojice izraelských vědců Ron Sender, Shai Fuchs a Ron Milo (Sender, Fuchs et al., 2016) zjistili, že údaj 10:1 přišel z článku Thomase D. Luckeyho (Luckey, 1972), přesněji z článku D. Sawage (Savage, 1977). Sender a spol. upravují poměr bakterií a lidských buněk na 1.3:1.

Zde zůstává prostor pro budoucí úpravy, protože nelze ještě kultivovat všechny druhy bakterií ani v dobře dostupných místech, a tak přesně zjistit jejich počet (Hulcr, Latimer et al., 2012).

3.3 Biotransformace látek

3.3.1 Metabolismus balastních látek

Při dekompozici těchto látek mikrobiotou vznikají především plyny oxid uhličitý, metan, vodík, kdy se jejich část resorbuje a mastné kyseliny s krátkým řetězcem, jež jsou důležitými produkty dekompozice těchto látek. Propionát a n-butyrát, představují cca 90 % všech takto vzniklých mastných kyselin, dále izobutyát, n-valerát a izovalerát. Kyseliny octová, propionová a máselná se tvoří v poměru 60:25:15 a sliznicí tlustého střeva se z více jak 95 % resorbují (Ruppin, Bar-Meir et al., 1980). Vzájemný poměr mastných kyselin závisí na typu sacharidů. Fermentace rezistentního škrobu je doprovázena vznikem velkého množství kyseliny máselné. Při vysoké nabídce substrátů tyto destrukční pochody probíhají převážně v proximální části tlustého střeva, kde velké množství nově vzniklých kyselin s krátkým řetězcem vytvoří slabé kyselé prostředí (pH 5.5-6.5). Resorpce SCFA je spjata s resorpcí sodíku a vody. Zatímco kyselina octová a propionová se po resorpci transportují do portálního oběhu, kyselina máselná se využije jako zdroj energie sliznicí střeva. Nedostatečná nabídka této kyseliny snižuje využití, resp. resorpci vody a sodíku za nepříznivého ovlivnění buněčné proliferace sliznice. Jako výsledek těchto událostí je snížena bariérová funkce sliznice a zvýší se translokace (Kasper and Burghardt, 2015). Déle trvající snížená produkce SCFA poškozuje sliznici tlustého střeva funkčně i morfologicky (Scheppach, Müller et al., 1997).

Aktivita bakteriálních enzymů je silně determinována typem a množstvím substrátu (Reddy, Engle et al., 1992), proto se mikrobiota v proximálnějších oddílech tlustého střeva, jako je cékum nebo *collon ascendens* (vzestupná část tlustého střeva) značně mění a neodpovídá složení distálnějších částí. Hill (1984) uvádí, že bakteriální složení ve stolici nepodává informace o vlivu výživových faktorů, zejména balastních látek, na mikrobiotu tlustého střeva. Bakteriální dekompozice a tvorba SCFA (a tím změny intraluminálního pH) probíhají v céku a *colon ascendens*, které podle autora nejsou dostupné k vyšetření. V těchto oddílech je třeba počítat s posunem ve spektru mikrobiálního osídlení.

Nestrávené balastní látky mají tedy kromě biochemického působení i působení mechanické. Ovlivňují dobu pasáže střevem, jeho motilitu a hmotnost stolice. Tranzitní doba

(intestinální tranzitní doba je čas uběhlý od příjmu potravy po vyloučení nestravitelných zbytků stolice) je vysoce variabilní, u většiny dospělých osob se pohybuje mezi 1-4 dny (Kasper and Burghardt, 2015). Toto kolísání je podmíněno výlučně změnou doby pasáže tlustého střeva (s vyšší hmotností stolice klesá tranzitní doba). Zvýšená hmotnost stolice má vliv i na intraluminální tlak dle Laplaceova zákona, který říká, že se zvyšujícím se poloměrem střeva a při zachování stejného napětí stěny, klesá tlak. Tento poloměr se zvětší už objemem stolice, která může nabrat objem v důsledku nestravitelných balastních látek, jež váží vodu. Výše přírůstku hmotnosti stolice nutně závisí na typu balastních látek a individuálních predispozicích, tj. na řadě faktorů.

Kromě výše zmíněných účinků ovlivňují balastní látky i resorpci mikronutrientů, toxických látek, cholesterolu, glukózy, tuků a dalších, jejichž rozbor pro účely informování této práce je nad rámec povinností.

Na základě výše popsaných mechanismů s podporou velkých studií jako Health Professionals Follow-up Study s více než 50 000 účastníků (Aldoori, Giovannucci et al., 1997), (Rydning and Berstad, 1985), prospektivní studie EPIC (European Protective Investigation and Nutrition) s 520 000 účastníky (Schatzkin, Mouw et al., 2007) a (Peters, Sinha et al., 2003) lze uzavřít, že balastní látky mají protektivní účinek před širokou plejádou onemocnění.

3.3.2 Metabolismus fenolických látek

Produkcí těchto látek zajišťují rostliny, řasy a některé bakterie. Nejdůležitější cestou k jejich tvorbě je přes šikimát, kdy dráha kyseliny šikimátové je společná jak pro rostliny, tak mikroorganismy. Na jejím konci vznikají fenylalanin a tyrosin. Právě fenylalanin je prekurzorem flavonoidů, ale třeba i stilbenoidů.

Mezi střevní bakterie, které by měli být schopny metabolizovat fenolické látky na jejich produkty, patří zástupci rodů *Bacteroides*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Eggertheila*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* a Bifidobacteria (Kim, Jung et al., 1998, Blaut and Clavel, 2007).

Flavonoly a resveratrol jsou inhibovány sulfatací jak v tenkém střevě, tak v játrech. Obě formy resveratrolu jsou glukuronidovány v trávicím traktu na 3-O a 4-O glukuronidy. Střevní buňky Caco-2 mohou glukuronidovat na 3-O metabolity, in vitro jsou toho schopny i jaterní mikrosomy (Forester and Waterhouse, 2009). Některé bakterie jsou schopné transformovat resveratrol na 3-O-beta-D-glukosid (Cichewicz and Kouzi, 1998). Střevní bakterie přeměňují

resveratrol na dihydroresveratrol. Bakterie mléčného kvašení dekonjugují tyto metabolity beta-glukosidasami (Walle, Hsieh et al., 2004).

3.3.3 Metabolismus stilbenoidních látek

Podobně jako u dalších polyfenolů, i stilbenoidní látky jsou ve střevech metabolisovány různým způsobem transientní a residentní mikrobiotou. Jedná se o procesy demethylace, redukce, štěpení aromatického kruhu dekarboxylace a dehydroxylace (Blaut et al., 2003, Rechner et al., 2004, Rio et al., 2012).

Příkladový stilbenoid resveratrol podstupuje různé reakce. V rostlinách je vyráběn z hexózy a proces zahrnuje 4 enzymy: fenylalanin amoniolyáza (PAL), 4-hydroxyláza skořicové kyseliny (4CH), 4-kumar-koenzym A ligáza (4CL) a stilbensyntázu (STS) (Mei, 2015). Proces probíhá tak, že PAL katalyzuje neoxidativní deaminaci fenylalanin-skořicové kyseliny a v návaznosti na to je skořicová kyselina přeměněna na p-skořicovou působením enzymu 4CH. Po této hydroxylaci dojde k další reakci s enzymem 4CL za vzniku 4-KumarylkoenzymA ten je pak spojen s Malonylem CoA působením enzymu STS za vzniku resveratrolu. Některé rostliny (*Zea mays*) mohou mít tento proces malinko odlišný (mohou použít tyrosin jako substrát pro p-skořicovou kyselinu) (Rosler, 1997). Přestože bakterie disponují enzymatickým systémem podporující tvorbu resveratrolu, kvasinky toto zjevně přirozeně neumí (Mei, 2015). Cesta genetického inženýrství by mohla takto vytvořit významný zdroj tohoto stilbenoidu.

Resveratrol může vzniknout i z jeho glukosidované formy v rostlinách, z molekuly polydatin. Polydatin je chemicky resveratrol s glukosidem na poloze meta. Přímo reakcí s glukosidázami tak může vznikat resveratrol, čímž se otvírá další zdroj tohoto stilbenoidu. Polydatin se nachází obzvláště v kořenech a kmeni některých druhů rostlin (Donez et al., 2009).

Kang et al. (2016) popisují produkci dalších stilbenoidů, methylovaných analog resveratrolu za použití bakterií kmene *E. coli*. Van Rymenant (2016) poukazuje na to, že i další balastní látky, přesněji jejich metabolity jako mastné kyseliny s krátkým řetězcem, při dlouhodobější konzumaci mohou ovlivňovat biologickou dostupnost polyfenolů.

3.4 Zánět

3.4.1 Fyziologický zánět

Zánět je složitá, fylogeneticky nejstarší odpověď obranné a reparační reakce, kterou organismus odpovídá na poškození svých buněk, případně vaskularizovaných tkání nejrůznějšími agens. Historické záznamy o zánětlivých onemocněních vyvolané poraněním jsou spjaty se starou Mezopotámií a Egyptem (Ryan and Majno, 1977). Zánětem organismus odpovídá na proniknutí infekčních patogenů, na cizorodé antigeny a v neposlední řadě na fyzikální, chemické nebo mechanické poškození svých tkání. Účelem zánětlivé odpovědi je zničení a odstranění poškozujícího faktoru, ohraničení zánětlivého ložiska, podpora specifické imunity a regenerace poškozené tkáně (Hořejší and Bartůňková, 2009).

První ucelenou představu o významu zánětu vytvořil I. I. Mečnikov, nicméně již dávno před ním anatomové určili hlavní znaky: tumor, dolor, rubor a calor, jež jsou platné dodnes (Hořejší and Bartůňková, 2009). Zánětlivé procesy rozlišujeme na specifické, tj. odpověď těla na napadení mikroorganismem, které zahrnuje široký soubor vrozených i získaných, obraných, regulujících a i poškozujících mechanismů, a nespecifické, rozvíjející se jako odpověď těla na chemické a fyzikální poškození a degenerace tkáně. Nevyvážená strava v ruku v ruce s obezitou negativně ovlivňují fyziologické pochody, jež dlouhodobě vyvolávají řadu onemocnění jako astma, idiopatické střevní záněty, lupenka a další autoimunitní choroby (Epstein, Barnes et al., 1997, Epstein and Ross, 1999, Svačina et al., 2010, Joseph, Edirisinghe et al., 2015). V zánětlivé odpovědi lze rozlišit 4 fáze: cévní odpověď, akutní buněčná odpověď, chronická buněčná odpověď a vyhojení (Kopřiva, 2005).

Cévní odpověď vzniká okamžitě po poškození tkáně a trvá i několik hodin. Počáteční vazokonstrikce je vyvolaná neuromediátory a je vzápětí následovaná vazodilatací způsobenou histaminem, serotoninem a bradykininem za současného zvýšení permeability stěny cév. Celý proces způsobí únik krevní plazmy a jejích bílkovin do *intersticia* nebo rozvoj edému, stupňovaného blokadou mízních kanálků. Dále se zvyšuje viskozita krve a zpomaluje její proudění. To za současné aktivace koagulačního systému a zvýšené agregace trombocytů vede k tvorbě mikrotrombů na periferii cévního řečiště.

Buněčná odpověď je zahájena lokálními granulocyty, které postupně podpoří monocyty, makrofágy a žírné buňky. Akumulované fagocyty v místě zánětu začnou vylučovat cytokiny a mediátory, které podporují prozánětlivé děje. V důsledku působení prozánětlivých chemotaktických mediátorů (histamin, trombin, C5a, TLB4) a zánětlivých cytokinů (IL-1, IL-

6, IL-8, TNF) dochází v leukocytech i v endotelových buňkách k aktivaci a expresi adhezních molekul. Tak se různé typy leukocytů mohou zachytit na stěnách cév a ovlivněny chemotaxiny proniknou skrze póry mezi endoteliemi kapilár do zánětem postiženého *intersticia*. Tyto buňky se podílejí na obraně přímými účinky na terčové buňky a posílením aktivity fagocytů (Kopřiva, 2005).

Přetrvávají-li potíže delší dobu, přechází zánět z akutní do chronické buněčné odpovědi. V takovém případě probíhá hojení a zánětlivá odpověď současně. Chronický zánět lze rozdělit do několika fází, kdy tu první lze pro její klinickou nenápadnost často přehlédnout. Chronický zánět se může rozvinout jak po akutním zánětu, tak vznikat *de novo*. Hlavní buňky fungující při chronickém zánětu jsou monocyty/makrofágy, lymfocyty a plasmatické buňky. Významnou úlohu mají monocyty tvořící cytokiny a proteázy schopné poškodit buněčnou membránu a schopné spustit metabolickou kaskádu kyseliny arachidonové. Leukotrieny jsou nezbytnou součástí mnoha dějů doprovázející chronický zánět (Kopřiva, 2005).

Pokud je vystavení zánětlivým mediatorům dlouhotrvající, vede to ke zvýšené buněčné proliferaci, mutagenezi, onkogenezi a angiogenezi (Shacter and Weitzman, 2002), lze tedy shrnout, že krátkodobá zánětlivá odezva imunitního systému je proces přinášející řadu výhod, naopak přetrvávající dlouhodobý zánět je bolestivý a škodlivý proces, jež by měl být řešen (Romieu, Sienra-Monge et al., 2004).

3.4.2 Cyklooxygenázy

Cyklooxygenázy (COX) jsou oxidoreduktázy, jež se nacházejí uvnitř buňky na endoplazmatickém retikulu. Vytvářejí z 20 uhlíkatých Ω -3 a Ω -6 kyselin látky zvané eikosanoidy, které dělíme na leukotrienty a prostanoidy. Mezi prostanoidy pak patří prostaglandiny, prostacykliny a thromboxany, jež fungují jako lokální mediátory. Podle různě zvoleného substrátu vznikají i odlišné látky. Jako výchozí látky jsou nyní známy kyselina arachidonová, kyselina eikosapentaenová, kyselina di-homo- γ -linolenová, které si tělo vytváří přes delta desaturasy a elongasy z jejich 18 uhlíkatých analog. U kyseliny juniperonové, jež vzniká v metabolismu před kyselinou eikosapentaenovou, nebyl zaznamenán vznik výše zmíněných látek, přestože splňuje podmínky 20 uhlíkatého skeletu a Ω -3) (Kasper and Burghardt, 2015).

Cyklooxygenázy jsou dvojího typu. Enzymy prvního typu (COX-1) mají konstitutivní formu. To znamená, že je vždy přítomná a aktivní, ovlivňuje činnost orgánů. COX-2 jsou inducibilní formou, tj. se indukuje teprve při zánětlivých pochodech. Pro některé orgány (cévní

endotel, děloha, ledviny a centrální nervová soustava) je i tento druhý typ cyklooxygenázy formou konstitutivní.

Kromě toho, že jejich působením vznikají různé druhy eikosanoidů, od sebe se vyznačují farmakologicky důležitou rozdílností. Molekula COX-2 má enzymový pór větší, nežli je tomu u molekuly COX-1. To znamená, že neselektivní inhibitory COX pronikají i do menších pórů, čímž inhibují oba enzymy. Mezi neselektivní inhibitory COX patří kyselina acetyl-salicylová používaná v denní dávce 0.3-6.0 g a její odvozeniny diklofenak v dávce 0.05-0.15 g, ibuprofen 0.6-2.4 g a naproxen 0.5-1.0 g (Lüllmann et al., 2007).

Protože dlouhodobá zánětlivá reakce je nežádoucí proces a v něm má významnou roli i enzym cyklooxygenázy, a protože neselektivní inhibitory zapříčiňují krvácení žaludku, gastritidu a ulcerace, má cílená inhibice nový zdravotní potenciál. Tak se podařilo vytvořit novější inhibitory enzymu pouze COX-2, jež přinášejí výhody, mezi které patří nižší riziko poničení sliznice. Z chemického hlediska (cílené na COX-2) se nyní jedná o látky tvořené heterocyklickým jádrem s dvěma fenylovými kruhy, kde u jednoho kruhu je substituce síranové skupiny v poloze para (Chen et al., 2008). Mezi takové látky patří rofecoxib s denní dávkou 12.25-25.0 mg a celecoxib v dávce 200-400 mg. Inhibitory COX-2 by měly být ovšem využívány pouze cíleně a ne pro každodenní praxi v případech, kdy antirevmatická terapie nesteroidními antiflogistiky evokovala poničení žaludeční sliznice. Vedlejší efekty jsou spojovány se znalostmi toho, že i COX-2 má svojí konstitutivní formu, která má svou úlohu v určitých místech. Navíc tu existuje určitý selektivní přesah, kdy inhibitory začnou ovlivňovat i COX-1. Tento experimentálně zjištěný poměr selektivity (COX-2/COX-1) se udává variabilně v rozsahu 20-30 (Lüllmann et al., 2007).

3.4.3 Eikosanoidy

Látky vytvořené enzymatickým systémem COX a lipoxygenázami slouží jako lokální hormony, do které patří prostaglandiny, prostacykliny, tromboxany a leukotrieny.

Podle zvoleného substrátu vznikají různě působící eikosanoidy. Z Kyseliny di-homo-gama-linolenové (DGLA) se vytváří prostaglandiny první série (TXA₁, PGD₁, PGE₁, PGI₁), z kyseliny arachidonové (AA) se vytváří prostaglandiny druhé série (TXA₂, PGE₂, PGI₁) a z kyseliny eikosapentaenové (EPA) vznikají prostaglandiny třetí série (TXA₃, PGE₃, PGI₃). Druhá a třetí série využívá stejný enzymatický systém, který upřednostňuje tvorbu eikosanoidů buď z AA nebo EPA na podkladě větší nabídky. To znamená, že se zde nachází i pro dietetický způsob (Kasper and Burghardt, 2015). Stilbenoidy ovlivňují tvorbu eikosanoidů z AA působením na enzymatický systém COX (Kutil et al., 2015).

Všeobecně platí, že prostaglandiny mají malý biologický poločas. Prostaglandin 2 (PGE₂) inhibuje tvorbu kyseliny v žaludku a opačně zvyšuje tvorbu ochranného mucinu. PGF₂ se uplatňuje ve vztazích dělohy a PGI₂ je vazodilatancium, které navíc navyšuje odstraňování sodíku ledvinami. Tyto konstitutivní účinky jsou cenné, ale prostaglandiny syntetizované v důsledku enzymatického působení COX-2 zcitlivují receptory bolesti, podporují zánětlivé pochody a jsou schopné vyvolat horečku.

Tromboxan a prostacyklin jsou antagonisté v procesu agregace krevních destiček. Leukotrieny, jejichž nomenklatura je matoucí (mají 4 dvojně vazby, 3 jsou ale v konjugovaném stavu) vznikají z leukocytů a mastocytů. Leukotrieny podporují zánětlivé pochody, migraci a aktivitu leukocytů a zvyšují cévní permeabilitu (Lüllmann et al., 2007). Další příklady jsou zmíněny v tabulce číslo 6.

Tab. 6: Eikosanoidy a jejich aktivita dle King (2016).

Eikosanoid	Hlavní místo syntézy	Hlavní biologická aktivita
LXA ₄	Krevní destičky, endotelové buňky, epitelové buňky sliznice a jiné leukocyty	Snižuje polymorfonukleární neutrofil (PMN) a eosinofilní infiltraci do míst zánětu, stimuluje monocyty neindukující zánět, stimuluje makrofágickou fagocytózu apoptotických PMN, blokuje IL-8, blokuje uvolnění a působení TNF- α , stimuluje TGF- β
LXB ₄	Krevní destičky, endotelové buňky, epitelové buňky sliznice a jiné leukocyty	Stejně jako LXA ₄
PGD ₂	Žírné buňky, eosinofily, mozek	Vyvolává zánětlivé odezvy hlavně v rekrutování eosinofilů a bazofilů; vyvolává zúžení průdušek; je zapojený do androgenní alopecie
PGE ₁		Vyvolává vazodilataci a inhibuje agregaci krevních destiček
PGE ₂	Ledviny, slezina, srdce	Navyšuje vazodilataci a produkci cAMP (Cyklický adenosinmonofosfát), zvyšuje účinky

		bradykininu a histaminu, vyvolává děložní kontrakce a agregaci krevních destiček, snižuje proliferaci T-buněk a migraci lymfocytů a sekreci IL-1 α a IL-2
PGF _{2α}	Ledviny, slezina, srdce	Zvyšuje vazokonstrikci, bronchokonstrikci a kontrakci hladkého svalstva
PGH ₂		Prekurzor tromboxanů A ₂ a B ₂ , indukuje agregaci destiček a vazokonstrikci
PGI ₂	Srdce, cévní endotel	Inhibuje destičky a agregaci leukocytů, snižuje proliferaci T-buněk, migraci lymfocytů a sekreci IL-1 a IL-2, vyvolává vazodilataci a produkci cAMP
TXA ₁		Vyvolává vazodilataci a inhibuje agregaci krevních destiček
TXA ₂	Krevní destičky	Vyvolává agregaci krevních destiček, vazokonstrikci, proliferaci lymfocytů a bronchokonstrikci
TXB ₂	Krevní destičky	Indukuje vazokonstrikci
LTB ₄	Monocyty, basofily, neutrofilny, eosinofily, žírné buňky, epitelové buňky	Silný induktor chemotaxe leukocytů a agregace, vaskulární permeability, proliferace T-buněk a podílí se na sekreci IFN- γ , IL-1 a IL-2
LTC ₄	Monocyty a alveolární makrofágy, basofily, eosinofily, žírné buňky, epitelové buňky	Složka SRS-A, mikrovaskulární vazokonstriktor, ovlivňuje vaskulární permeabilitu, bronchokonstrikci a sekreci IFN- γ , nabírá leukocyty v místě zánětu, zvyšuje sekreci hlenu v dýchacích cestách a střev
LTD ₄	Monocyty a alveolární makrofágy, basofily, eosinofily, žírné buňky, epitelové buňky	Stejně jako LTC ₄
LTE ₄	Žírné buňky a basofily	Stejně jako LTC ₄

Podle různě zvoleného substrátu vznikají často protichůdně působící eikosanoidy. Kyselina arachidonová soupeří o enzymatický systém COX s kyselinou eikosapentaenovou a ta která převáží, potom ovlivňuje tkáň okolo sebe.

Kyselina arachidonová a její deriváty mají zánětlivé působení, které pravděpodobně ovlivňuje i takové onemocnění, jakou je lupenka, když se u pacientů podařilo zjistit v postižené tkáni až 20násobné množství kyseliny arachidonové, než je běžné (Kasper and Burghardt, 2015).

Dalším příkladem je vytvoření bludného kruhu v případě revmatické artritidy (RA). RA je progresivní zánětlivé onemocnění kloubů postihující převážně malé klouby na prstech rukou a nohou. Prvotní poškození vyvolá zánět synoviálních membrán, jež doprovází uvolněné antigeny udržující zánět. Antigen je tak navázán na synoviální buňky, čímž se aktivují lymfocyty. Lymfocyty a makrofágy společně zánětlivý proces zintenzivňují, jak makrofágy uvolňují cytokiny, které exprimují geny pro COX-2, které vytváří zánětlivé prostaglandiny. Tak se zesiluje zánět, který zesiluje aktivitu makrofágů a lymfocytů.

V případě RA lze sice podat látky inhibující syntézu COX-2 nebo neselektivní inhibitory, nicméně ty doprovází vedlejší účinky při chronickém užívání a tyto látky, ani případně glukokortikoidy, nejsou schopné zabránit progresi onemocnění, a tak se upřednostňuje synovektomie (odstranění synoviální tkáň chirurgickou cestou).

Dosud se nepodařilo syntetizovat stabilní farmakologicky účinné prostaglandinové deriváty. Některé se ale používají, jako misoprostol, dinoproston či mifeproston (Lüllmann et al., 2007).

3.5 Metody purifikace a měření polyfenolů

Extrakce je stěžejní krok stojící na počátku celé analýzy. V průběhu extrakce se složky rozdělují na základě rozdělovacího koeficientu, oddělují se od přebytečné matrice a konečně odpaří inertním plynem za zanechání zkoumaného analytu na stěnách odpařovací nádoby.

Rozpouštědla se volí s přihlédnutím k jejich chemicko-fyzikálním vlastnostem, kdy stěžejní je polarita. Méně polární polyfenoly se extrahují rozpouštědly, jakými jsou chloroform a etyl-acetát, pro polárnější se používá směs voda-etanol.

Pro extrakci se používá několik purifikačních postupů, mezi které patří metody z kapaliny do kapaliny (LLE), mikrovlnná extrakce (MAE), ultrazvuková extrakce (UAE), superkritická fluidní extrakce (SFE), tlaková kapalinová extrakce (PLE) a extrakce na pevné

fázi (SPE). Každý postup přináší jistá pozitiva a negativa v porovnání s ostatními, jakými jsou spotřeba chemických rozpouštědel často protichůdně k selektivitě.

3.5.1 Metoda LLE

Anglicky Liquid-liquid extraction je způsob čištění vzorků od balastů pracující na základě přechodu určitých látek z jedné kapaliny do kapaliny druhé, který popisuje Nernstův distribuční koeficient. Organické rozpouštědlo je nemísitelné s vodou, a tak jej lze mechanicky oddělit i s látkami v něm obsažených. Protože se zkoumané látky nepřevedou úplně do organické fáze, tradičně se postup opakuje. Nevýhodou se zdá být použití organických rozpouštědel (Mustafa a Turner, 2011).

3.5.2 Metoda MAE

Využití elektromagnetického neionizujícího záření nachází uplatnění i v případě purifikace. Rozdíl oproti běžnému záhřevu je v tom, kde vzniká teplo, tj. konvenční záhřev postupuje od povrchu matrice ku středu, mikrovlnné záření prochází do středu matrice a v ní evokuje rozkmitání molekul. Protože mohou být ohřáty pouze polární molekuly, je tento způsob selektivní. Výhodou jsou nižší náklady a množství rozpouštědla. Nevýhodou je, že selektivita je v přítomnosti nefenolového materiálu menší.

3.5.3 Metoda UAE

Jedná se o novější metodu využívající ultrazvukové vlny. Jedná se spíše o velice levnou dopomocnou cestu k rozrušení matrice, jež se pod vlivem ultrasonických vln rozpadne, a tak více zpřístupní analyty k extrakci jinou metodou. Protože ultrazvuk může vytvářet teplo, tak zvýšená teplota může negativně ovlivnit termolabilní látky (Kivilompolo, 2009).

3.5.4 Metoda SFE

Použití superkritické fluidní extrakce vyžaduje nastolení podmínek pro vytvoření kapaliny v superkritickém stavu. To znamená, že za určité teploty a tlaku získává rozpouštědlo jiné vlastnosti, kterých se využívá pro extrakci látek. Takováto tekutina má vlastnosti na rozhraní plynné a tekuté fáze, což usnadňuje difúzi a urychluje extrakci. Často se připojuje k chromatografům.

Za osvědčenou „tekutinu“ se považuje oxid uhličitý (kritická teplota 31 °C a tlak 7 149 kPa), vzhledem k teplotě, ekonomickému a ekologickému aspektu (Nováková et al., 2013).

3.5.5 Metoda PLE

Protože tlak a teplota jsou schopny významně ovlivnit způsob extrakce, využívá se tohoto poznání v metodě tlakové kapalinové extrakce. Při použití vyšší teploty dochází ke snížení viskozity rozpouštědla, a tak k lepšímu rozpouštění. PLE má dvě nastavení: statické a dynamické. Obvykle se používá statické. Výhodou je, že jako rozpouštědlo se používá ekologicky a finančně nenáročná voda.

3.5.6 Metoda SPE

Metoda pracuje na principu zachycování pevných částic na kolonku. Připomíná metodu LLE s tím rozdílem, že se látky zachycují na pevné fázi. Obecně se pevná fáze nejprve kondiciuje, equilibruje a postupně pročišťuje vodou a organickým rozpouštědlem. Zachycené analyty se nakonec smyjí. Pevná fáze bývá obvykle na bázi silikagelu s uhlíkatými ligandy. Síly uplatňující se v těchto reakcích bývají různé. Patří mezi ně dipól-dipólové interakce, van der Waalsovy síly a vodíkové vazby. V některých případech lze použít kolonky se zachyceným analytem k přechovávání, resp. transportu (Berrueta et al., 1995).

3.6 Chromatografie

Prvním doložené použití chromatografie sahá k počátkům 20. století na území Ruska, kdy rodilý botanik Michail Cvet použil kolonu naplněnou uhličitánem vápenatým k oddělení rostlinných chlorofylů. Protože chlorofyly jsou barevné substance, jejich dělení šlo pozorovat pouhým okem, a tak metoda dostala název chromatografie. Princip metody zůstal nevyužit až do počátku padesátých let, kdy jí použili Martin a Syng. V roce 1952 obdrželi Nobelovu cenu za práci spojenou s touto metodou.

Postupně se vyvíjelo mnoho variací této metody: chromatografie na tenké vrstvě (TLC), plynová chromatografie (GC) a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), ale možností je více. Po čase se utvářely více dimenzionální chromatografy (2-D), zlepšovaly kolony a součástky a s tím se postupně zvyšoval nárok na analyzátory.

3.6.1 TLC

Chromatografie na tenké vrstvě se využívala k analýze polyfenolových sloučenin od 70. let a ještě nedávno se používala. V potravinářském průmyslu nenašla většího uplatnění. Její výhodou byla rychlost, ale postupně ustoupila do pozadí před přesnějšími metodami, které jsou schopny polyfenoly stanovit i dobře kvantitativně.

Tradičně se používala jako stacionární fáze celulóza, silikagel a polyamid v prostředí polyethylenglykolu za použití UV záření pro detekci (Stalikas, 2007).

3.6.2 GC

Plynová chromatografie využívá těkavých vlastností látek. Používá se k detekci nepolárních látek o nízkých molekulových hmotnostech, jakými jsou polyaromatické uhlovodíky. První použití této metody k analýze polyfenolů se datuje na počátek 70. let.

Aby plynová chromatografie dobře změřila polyfenolické látky, musí před samotným měřením projít derivatizací za účelem zlepšení těkavosti a zvýšení termostability. Tak vznikají trimethylsilylery. Mezi nejčastěji používaná derivatizační činidla patří N,O-bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamid a N-(tert-butyldimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamid (Stalikas, 2007).

Po příchodu kapalinové chromatografie ustoupila tato metoda k analýze polyfenolů do pozadí.

3.6.3 HPLC

Z anglického High Performance Liquid Chromatography je metoda, jež využívá kapalnou mobilní fázi k průtoku stacionární fází, nejčastěji silikagelem s nepolárními alkyly, které ovlivňují průchod rozpuštěné analyzované složky na základě fyzikálně-chemických vlastností, jakými jsou polarita a velikost molekul.

Existují různé módy i úpravy pro zlepšení separace cílených molekul, mezi které patří módy hydrofobní interakční chromatografie (HIC), hydrofilní interakční chromatografie (HILIC), normální fáze (NP) a reverzní fáze (RP), kterých se dosahuje úpravou zvolené mobilní fáze a použité kolony (Nováková et al., 2013).

Kapalinová chromatografie je využívána i pro separaci rostlinných polyfenolů a jejich metabolitů pro jejich nepolaritu a velikost molekul, pro které se nejčastěji používá mód reverzní fáze s nepolární kolonou s C 18 či C 8 alkyly. Jako eluent se uplatňuje binární fáze, příkladem roztok methanolu s kyselinou mravenčí, ale lze ji redundovat vodou, resp. kyselinou octovou a dalšími organickými rozpouštědly. V praxi se uplatňuje gradientová eluce, méně často se využívá isokratická eluce. Mobilní fáze vycházející z kolony do detektoru se nazývá efluent.

Metoda pro stanovení flavonoidů za pomoci HPLC byla publikována už v roce 1976 a v dalších letech postupně aktualizována (Merken et al., 2000). V roce 2009 byla publikována metodologie pro stanovení jednotlivých tříd fenolických kyselin, flavonoidů a stilbenů (Francisco and Resurreccion, 2009).

Nezbytnou součástí kapalinové chromatografie je analyzátor a detektor. Ty jsou používány v on-line spojení s HPLC. Mezi běžně používané patří detektory absorbující ultrafialové a viditelné záření (UV-VIS) pracující na Lambert-Beerově zákoně. Významný vliv na absorpční spektrum poskytuje fenolický kruh. Flavonoidy tak mají absorpční spektrum 300-550 nm a 240-285 nm v závislosti na kruhu. Dalším obdobným detektorem je detektor diodového pole (DAD). Jak UV-VIS, tak DAD mají v dnešní době spoustu nedostatků v neschopnosti poskytnout hodnotné strukturální informace. Proto plní spíše doprovodnou funkci k účinnějším detektorům (Nováková et al., 2013).

3.6.3.1 HPLC-MS

Hlavním typem spojení tak zůstává HPLC-MS, kdy hmotnostní spektrometr se dá upravit podle potřeb analýzy. Hmotnostní spektrometr nejprve musí zkoumanou molekulu ionizovat, poté urychlit, nasměrovat, analyzovat a detekovat. Hmotnostní spektrometr rozlišuje ionty podle poměru hmotnosti a náboje (m/z). Výhodami jsou vysoká citlivost metody, kvalitativní a kvantitativní analýza s minimální spotřebou vzorku. Nevýhodou pak, že se jedná o destruktivní metodu a značné pořizovací náklady.

Ionizaci obstarává iontový zdroj, který se člení na metody měkké a tvrdé. Mezi měkké patří elektrosprej (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI), fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI), laserová desorpce za účasti matrice v offline spojení (MALDI-offline) a desorpční elektrosprej ionizace (DESI). Mezi tvrdé ionizační techniky patří tradičně elektronová ionizace (EI) a chemická ionizace (CI). Výhodou u tvrdé ionizační techniky je, že existuje pro ni knihovna. Nevýhodou pak těžká fragmentace. Tvrdé techniky se upřednostňují v GC, měkké v LC. V některých případech (EI, CI, MALDI) musí ionizace probíhat za sníženého tlaku, což vytváří tlak na potřebné vakuové zařízení.

Srdcem hmotnostního spektrometru je hmotnostní analyzátor. Ten je tradičně umístěný za iontovým zdrojem a před detektorem.

Dělení iontů probíhá za vysokého vakua v závislosti použitého analyzátoru. V současnosti je známo 5 principů, na kterých se ionty dle m/z rozdělují. Mezi takové analyzátory pak patří magnetický analyzátor (B), kvadrupól (Q), lineární a sférická iontová past (IP), analyzátor doby letu (TOF), Orbitrap (O) a iontová cyklotronová resonance (ICR).

Detekce probíhá buď na elektronovém násobiči, fotonásobiči nebo faradayově kleci. Ve všech případech se jedná o dynody, které zesilují elektronový signál.

Speciální kategorií jsou tandemové a hybridní hmotnostní analyzátory. Tandemové jsou tvořeny spojením několika spektrometrů, jako trojitý kvadrupól (QqQ). Hybridní pak využívají rozdílných vlastností jednotlivých analyzátorů, jako kvadrupól-lineární past (Q-LIT) nebo kvadrupól-analyzátor doby letu (Q-TOF).

V případě polyfenolických látek lze použít různé hmotnostní analyzátory, příkladem Q, QqQ, TOF a IT. Chceme-li kvantitativně měřit polyfenoly, můžeme použít trojitý kvadrupól v módu MRM (Multiple Reaction Monitoring). Iontová past přináší využití MS^n , která je využitelná pro strukturní analýzy, ale za přibližného rozlišení QqQ. Kombinace Q-TOF přináší další informace o struktuře látky, které díky výběru mateřského iontu zvyšují selektivitu (Nováková et al., 2013).

4 Materiál a Metody

4.1 Materiál

K analýze byl použit vzorek darované stolice od dárce držící více než 48 hodin bezpolyfenolovou. Zkoumané metabolity stilbenoidů byly postupně odebírány v časovém odstupu 0, 2, 4, 8, 24 a 48 hodin.

4.1.1 Chemikálie

4.1.1.1 Chemikálie pro extrakci-inkubaci

Hydrogenuhlíčan amonný, hydrogenuhlíčan sodný, dihydrát hydrogenfosforečnanu sodného, dihydrogenfosforečnan draselný, heptahydrát síranu hořečnatého, dihydrát chloridu vápenatého, tetrahydrát chloridu manganatého, hexahydrát chloridu kobaltnatého, hexahydrát chloridu železitého, trypton, resazurin, dihydrát hydrogenfosforečnanu sodného, cystein hydrochlorid, hydroxid sodný, sulfidu sodného, plyn OFN (oxygen free nitrogen), kyselina chlorovodíková, dimethylsulfoxid

Batatasin III (ChemFaces CFS201601 98% – Čína), Piceatannol (ChemFaces CFS201503 98% – Čína), Piceatannol-3-O-glukosid (ChemFaces CFS201601 98% – Čína), Thunalben (ChemFaces CFS201601 98% – Čína), Pinostilben (ChemFaces CFS201601 98% – Čína), Pinostilbenosid (ChemFaces CFS201601 98% – Čína), Resveratrol (Sigma-Aldrich 2015-2020 – Německo) a Oxyresveratrol (Sigma-Aldrich 2015-2020 – Německo), Značený Resveratrol 13 (Sigma-Aldrich 2015-2020 – Německo)

4.1.1.2 Chemikálie určené pro purifikaci

Etyl-acetát (Honeywell, Riedel-de Haën, Sigma-Aldrich – Německo), Mili Q (Direct Q 3 UV), plynný dusík

4.1.1.3 Chemikálie použité při měření

Mili Q voda (Direct Q 3 UV), methanol ABS. LC-MS (Biosolve – Francie), kyselina mravenčí (Fisher Scientific 98+% – Belgie)

4.1.2 Přístroje

Inkubátor 1000, Heidolph – Německo

Centrifuga Rotanta 460R – Německo

UHPLC Ultimate 3000, Thermo Scientific – USA

MS Q-TOF Impact II Bruker Daltonic – Německo

Temperovaný dusíkatý koncentrátor NSK2000-2 Hangzhou Miu Instruments – Čína

Vortex Phoenix Instrument RS-VF10 – Německo

Vodní purifikační systém pro Mili Q vodu Direct Q 3UV Milipore – USA

4.2 Experiment

Experiment byl dimenzován tak, aby mikroorganismy získané z dárců simulovaly v prostředí podobné střevu metabolismus zkoumaných látek v přesně daném časovém sledu, a ty pak byly zbaveny matrice metodou LLE, která se ukázala v porovnání s SPE výkonnější, a analyzovány za pomoci metody LC-Q-TOF. Jedná se o kombinaci cílené a necílené analýzy za účelem nalezení určitých metabolitů, které by měla lidská střevní mikrobiota utvářet a jež se potom mohou zapojovat do fungování organismu.

4.2.1 Fermentace vzorků

Vzorky stolice byly získány od dárce držící minimálně 48 hodin polyfenolovou dietu. Ty byly následně kultivovány v médiu a naočkovány roztoky komerčních standardů batatasinu III (BAT), piceatannolu (PIC), piceatannol-3-O-glukosidu (PGL), thunalbenu (THU), pinostilbenu (PIN), pinostilbenosidu (PST), resveratrolu (RES) a oxyresveratrolu (OXY) rozpuštěných v dimethylsulfoxidu (DMSO). Dále byla vytvořena skupina značeného Resveratrolu C13 (značení poloviny molekuly) a Resveratrolu rozpuštěného čistě jen v pufru (značené jako RES-K) a přiložené z důvodu zjištění vlivu samotného pufru na stilbenoidy.

Uhličitanový pufr byl připraven rozpuštěním 1 g hydrogenuhličitanu amonného a 8.75 g hydrogenuhličitanu sodného ve 250 ml destilované vody.

Roztok makromineralů byl vytvořen rozpuštěním 7.14 g dihydrátu hydrogenfosforečnanu sodného, 6.2 g dihydrogenfosforečnanu draselného a 0.6 g heptahydrátu síranu hořečnatého v 1 litru destilované vody.

Mikromineralní roztok vznikl rozpuštěním 2.64 g dihydrátu chloridu vápenatého, 2 g tetrahydrátu chloridu manganatého, 0.2 g hexahydrátu chloridu kobaltnatého a 1.6 g hexahydrátu chloridu železitého ve 20 ml destilované vody.

Fermentační medium bylo získáno smísením 1.125 g tryptonu v 225 ml destilované vody, 56.25 µl mikromineralního roztoku, 112.5 ml uhličitanového roztoku, 112.5 ml makromineralního roztoku a 562.5 µl 0.1% resazurinového roztoku.

Pufir pro fekální suspenzi byl vytvořen smísením 1: 14 M dihydrogenfosforečnanu draselného 195 ml a 305 ml 1: 14M dihydrátu hydrogen fosforečnanu sodného s vyrovnaným pH 7.0

Další den byly vzorky zkoumaných stilbenoidů rozpuštěny v dimethylsulfoxidu na koncentraci 10 mg/ml pro každý.

Redukující roztok vznikl rozpuštěním 125 mg cystein hydrochloridu, 0.8 ml 1M hydroxidu sodného a 125 mg sulfidu sodného ve 20 ml destilované vody.

120 ml fosfátového pufru a 500 ml fermentačního média z předchozího dne byly přivedeny k varu dobu 7 minut a následně zchlazeny na přibližnou teplotu 37 °C a pročištěny 30 minut OFN do růžové barvy. pH bylo následně vyrovnáno na 7 s pomocí 6 M kyseliny chlorovodíkové. Nakonec bylo přeneseno 16.8 ml média do fermentační láhve a k němu se dodalo 0.8 ml redukujícího roztoku pomocí stříkačky. Takto připravená směs byla smíšena se stolicí od provedení do 10-11 hodin.

Suspenze se ze stolice připravila homogenizací 24 g čerstvé stolice (1-2 hodiny) v 75 ml pufru pro vytvoření 32% suspenze v pro to udělaném pytlíku (stomacher bag) (30s). Vzniklá kaše byla přefiltrována a 2 ml z ní bylo smíšeno s 20 µl testovaného stilbenoidu o finální koncentraci 10.194 µg/ml. Vzorek byl promíchán a byly z něj připraveny vždy 4 kopie o objemu 750 µl ve zkumavkách eppendorf 3ml. Pro další hodiny se postup odběru alikvotů opakoval v přesně daném časovém měřítku (0,2,4,8,24 a 48 hodin), fermentace probíhala na horizontální třepačce při tělesné teplotě 37°C.

Skladování probíhalo při -80 °C ne déle než půl roku.

4.2.2 Čistění vzorků

Fermentované vzorky 0, 2, 4, 8, 12, 24 a 48 hodin byly centrifugovány po dobu 5 minut a 15 000 otáčkách. Následně bylo přidáno do 15 ml centrifugační plastové zkumavky 2 ml Mili Q vody, 2.5 ml etyl-acetátu a 25 µl označeného resveratrolu C13 o koncentraci 2 µg/ml. Po promíchání na vortexu a centrifugaci po dobu 5 minut a 4 600 otáčkách byla kvantitativně odebrána etyl-acetátová frakce Pasteurovou pipetou a zpětně doplněna dalšími 2.5 ml. Po další vortexaci

a stočení byla znovu odebrána etyl-acetátová část a přidána k předchozí. Etyl-acetátový extrakt byl poté odpařen proudem dusíku. Po odpaření byla sušina rozpuštěna v 1 ml methanolu s 1% kyselinou mravenčí (v/v).

4.2.3 Měření vzorků

Stilbenoidy byly stanovovány pomocí LC-MS systému sestávající se z chromatografické jednotky UPLC Ultimate 3000 Thermofisher Scientific – USA a Q-TOF Impact II od Bruker Daltonik.

Použitá kolona: Kinetex 1.7 mm F5 100 Å 100x2.1 mm Phenomenex – USA

Mobilní fáze: LC-MS voda a methanol s kyselinou mravenčí (999:1).

Vzorky byly rozpuštěny v 1 ml roztoku methanolu a kyseliny mravenčí (99:1).

Teplota kolony: 35 °C

Autosampler chlazený na 10 °C

Nástřik: 5 µl

Rychlost průtoku: 0,2 ml

Gradient: mobilní fáze A: UPLC Voda, mobilní fáze B: Methanol s kyselinou mravenčí (0.1%)

V čase nula byl průtok mobilní fází A a B v poměru 8:2. V třetí minutě byl poměr eluentů 1:1, v šesté minutě byla pouze mobilní fáze B. Ta se isokraticky udržovala do patnácté minuty. Mezi patnáctou a šestnáctou minutou byl změněn poměr na 8:2. Od šestnácté do dvacáté minuty byla udržována rovnováha stále v poměru 8:2.

Nejprve byla provedena kalibrace na formiát sodný

Parametry ionizačního zdroje:

End plate offset: 500 V

Capillary: 3 000 V

Tlak nebulizačního plynu: 0,3 Barů

Průtok sušícího plynu: 4L/min

Teplota zdroje: 250 °C

Spektra byla snímána při frekvenci 1 Hz a měřena v rozsahu 500-1 500 m/z

Měření byla prováděna v režimu FullScan

Q-TOF měřil v negativním módu

Měření probíhalo pro všechny časy a byly vsazeny blanky k oddělení různých vzorků

Software:

Parametry metody měření byly nastaveny pro MS v Otof Series 4.0, (Bruker Daltonik – Německo) a Chromeleon Xpress (Thermo Fisher Scientific – USA).

Pro vytváření sekvencí a předběžné zpracování dat byl použit software HyStar verze 3.2 SR4.

Diferenční analýza spekter a chromatografů byla prováděna za pomoci software Metabolite Detect 2.0 SR 4 (Bruker Daltonik– Německo)

Výstupní data byla zpracována nejprve programem DataAnalysis 4.3 (Bruker Daltonik – Německo)

Screening a semikvantitativní srovnání bylo prováděno programem TASQ 2.2. (Bruker Daltonik – Německo).

5 Výsledky

5.1 Výsledky stanovené UPLC-Q-TOF a DataAnalysis

V Tab. 7 jsou výsledky vybraných stilbenoidních látek fermentovaných ve vzorcích stolice v časech 0 h, 8 h a 48 h. Intenzita a retenční časy byly zjišťovány pomocí software DataAnalysis 4.3. Největší intenzity dosahovaly vzorky při kratší době fermentace. Nejvyšší odezvu ze všech měřených látek měl resveratrol v čase 0 h a 8 h a batatasin v čase 48 h, který měl zároveň nejvyšší retenci. Nejvyšší pokles intenzity měl resveratrol mezi 8 h a 48 h.

Tab. 7: Výsledky analýzy plochy píků měřených stilbenoidů ve vybraných časech

	0 h	0 h	8 h	8 h	48 h	48 h
	Plocha píku	RT (min)	Plocha píku	RT (min)	Plocha píku	RT (min)
BAT	603617	7.9	466520	7.9	381681	7.9
OXY	59343	6.3	-	-	-	-
PGL	-	-	-	-	-	-
PIC	172237	6.8	126487	6.7	-	-
PIN	-	-	48104	7.7	38199	7.7
PST	-	-	-	-	-	-
RES	841837	7.2	668848	7.2	133921	7.2
THU	-	-	-	-	-	-

BAT – batatasin, OXY – oxyresveratrol, PGL – piceatannol-3-O-glukosid, PIC – piceatannol, PIN – pinostilben, PST – pinostilbenosid, RES – resveratrol, THU – thunalben , RT (min) – retenční čas v minutě

V tab. 8 jsou uvedeny výsledky nalezených metabolitů ve vybraných časech. Nejvíce bylo detekováno metabolitů PIC (3), poté BAT (2). Nejintenzivněji probíhala metabolizace PIC na RES (120 000), vzápětí čisté odstranění OH skupiny PIC (48 000).

Tab. 8: Výsledky měření intenzity metabolitů stilbenoidů ve vybraných časech

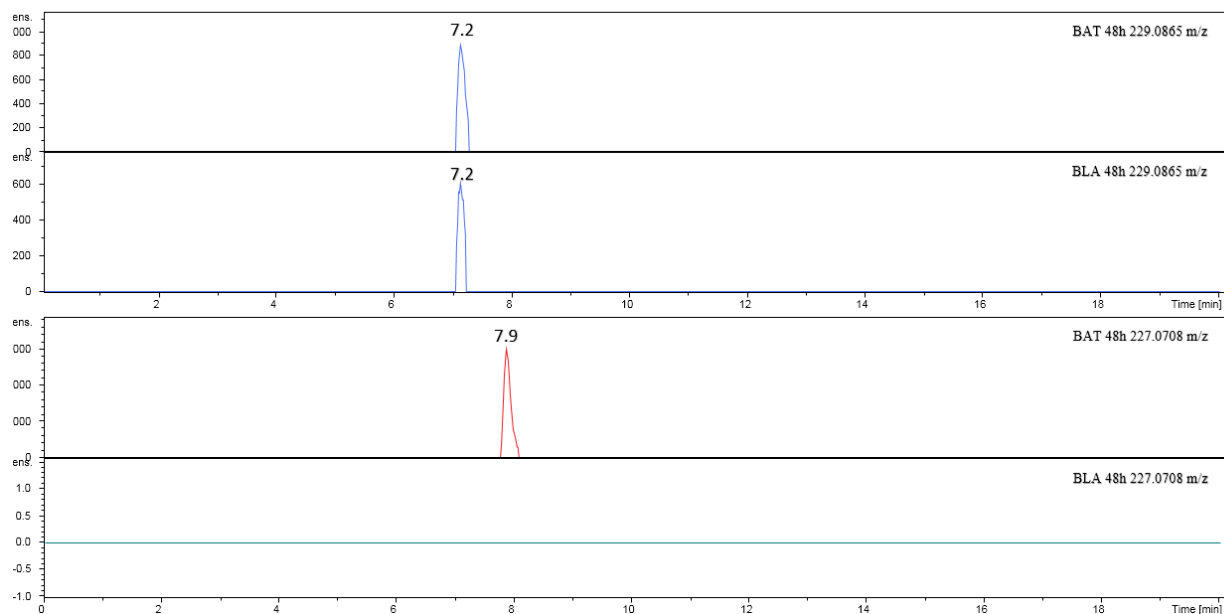
	0 h	0 h	48 h	48 h
	Plocha píku	RT (min)	Plocha píku	RT (min)
BAT (-CH ₃)	-	-	980	7.2
BAT (-CH ₄)	-	-	2964	7.9
PIC (+2H)	-	-	395	7.2
PIC (-OH)	400	7.3	48000	7.3
PIC (+2H, -OH)	800	7.2	120000	7.2
RES (+2H)	-	-	45046	7.0
THU (-CH ₃)	-	-	17000	7.9

-CH₃ – ztráta methylu, -CH₄ – ztráta methylu a přidaná dvojná vazba, -OH – ztráta hydroxyly, +2H redukce dvojná vazby, RT (min) – retenční čas v minutě

5.2 Grafické výstupy software DataAnalysis 4.3.

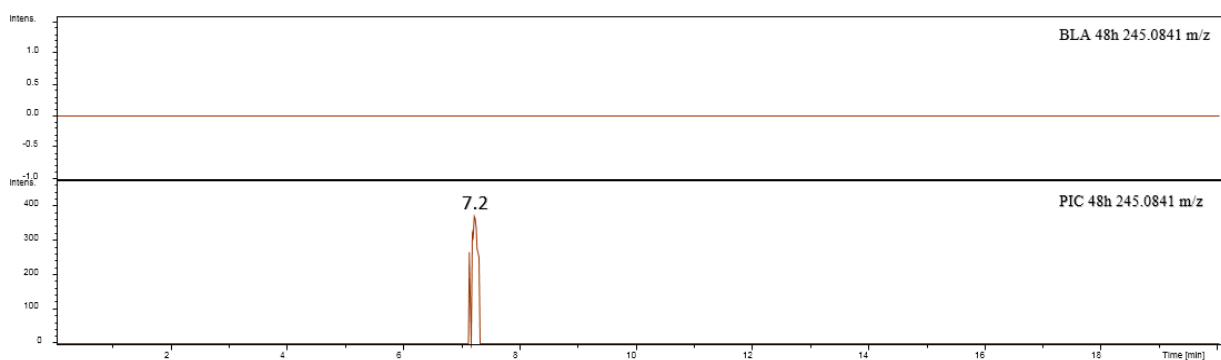
Obrázek 3 ukazuje chromatogramy metabolitů batatasinu III v porovnání s neošetřenou kontrolou vzorku. Horní pík s retenčním časem 7.2 odpovídá demethylovanému metabolitu a je totožný s píkem kontrolního vzorku bez přídavku batatasinu III, jen se liší intenzitou a jedná se zřejmě o rezidua pocházející z diety dárce. Na spodním chromatogramu je zřejmý pík s RT 7.9 odpovídající svou přesnou molekulovou hmotností deprotonovanému iontu demethylovaného batatasinu III.

Obr. 3: Metabolity batatasinu III



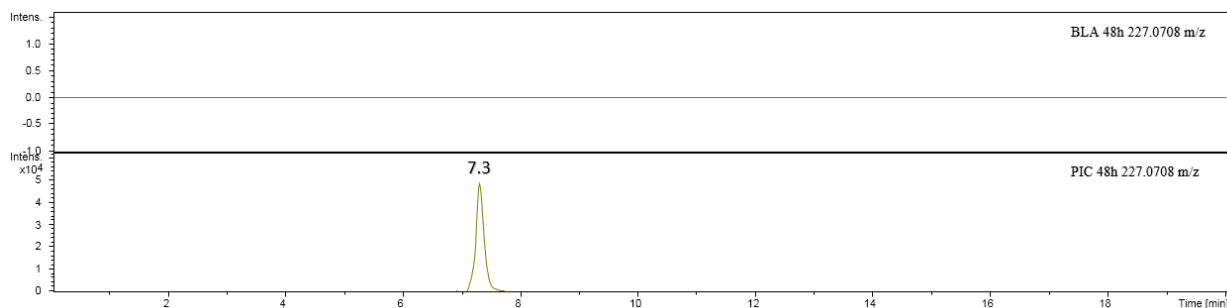
Na obrázku 4 jsou v RT 7.2 stopové odezvy odpovídajícího metabolitu piceatannolu s redukovanou dvojnou vazbou. Pro porovnání je na horním chromatogramu a stejným m/z uveden vzorek neošetřené kontroly.

Obr. 4: Metabolit piceatannolu s redukovanou dvojnou vazbou



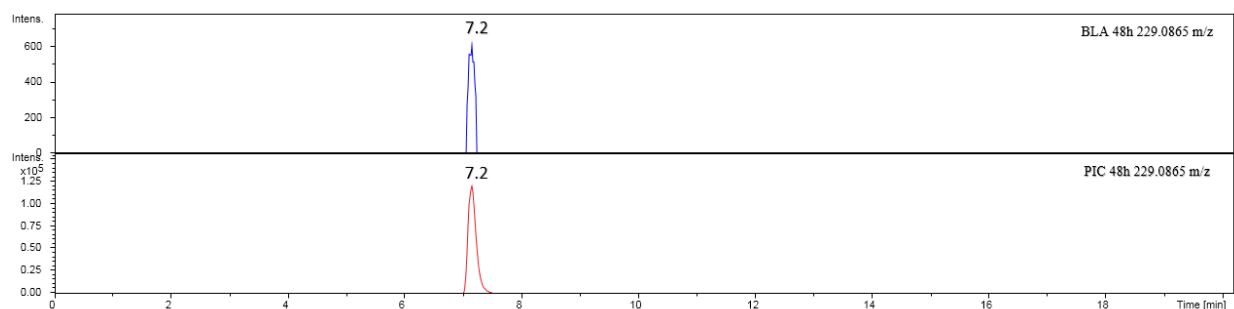
Metabolit vzniklý dehydroxyací piceatannolu byl detekován v RT 7.3; na obrázku číslo 5 je znázorněn v porovnání s kontrolou.

Obr. 5: Metabolit piceatannolu bez hydroxyly



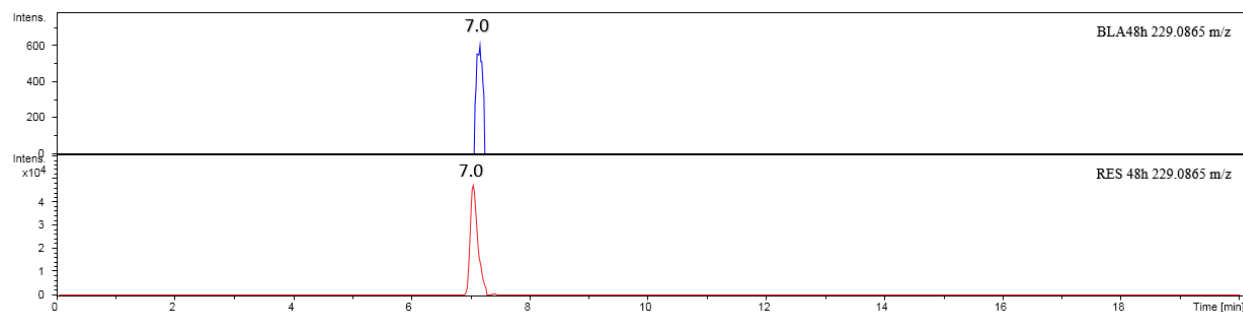
Piceatannol podstupující 2 metabolické kroky je znázorněn obrázkem 6. V čase 7.2 je patrný pík s m/z 229.0865 o poměrně vysoké intenzitě. V kontrole ve stejném čase jsou detekovatelné pouze stopy pozůstatku z diety dárce.

Obr. 6: Metabolit piceatannolu bez hydroxyly a dvojně vazby



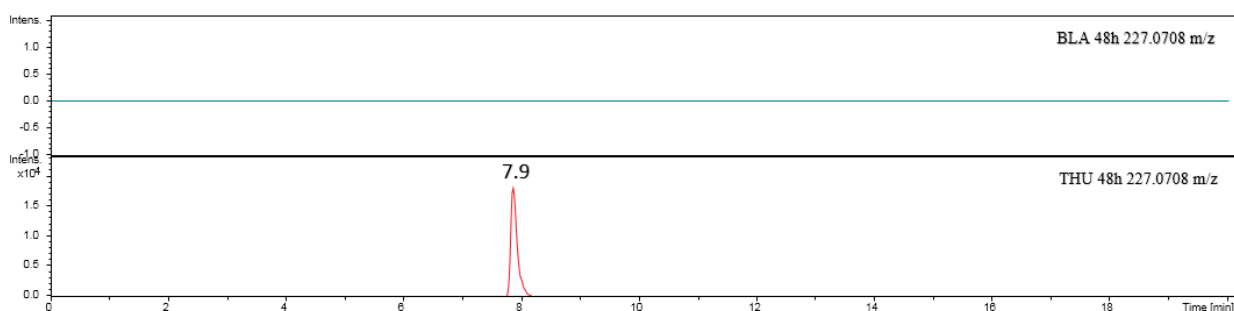
Metabolit resveratrolu dihydroresveratrol s m/z 229.0865 naměřený v RT 7.0 je zobrazen na chromatogramu na obrázku 7.

Obr. 7: Metabolit resveratrolu bez dvojně vazby



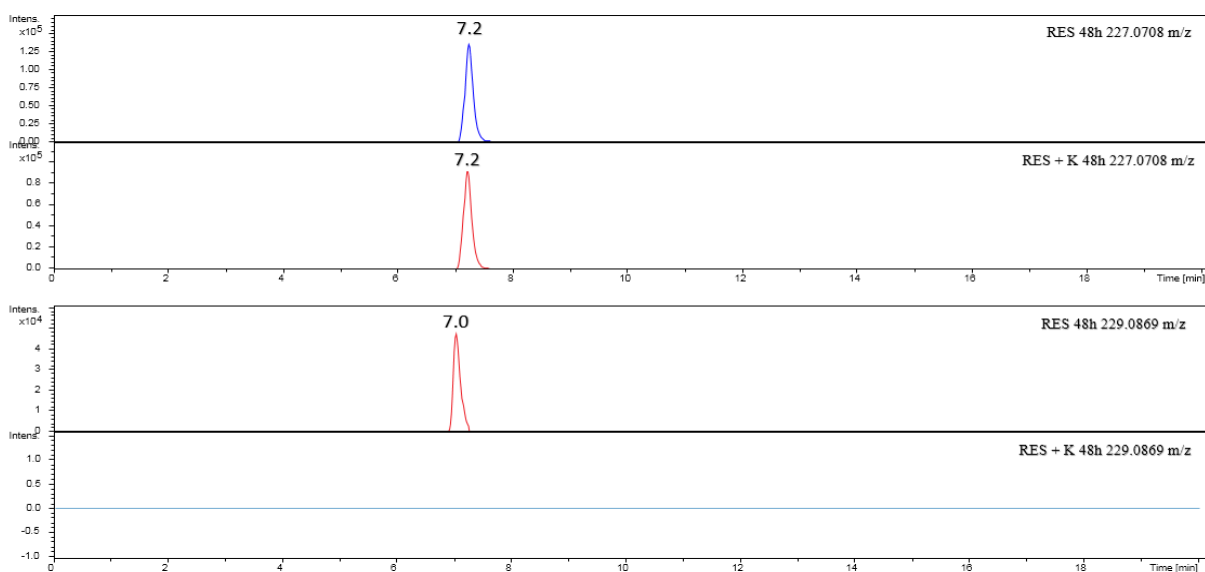
Obrázek 8 znázorňuje thunalben po ztrátě methylové skupiny, který má identické prvkové složení, a tedy i identickou molekulovou hmotnost iontu m/z (227.0708) jako resveratrol. Nicméně za daných chromatografických podmínek měl RT posunut na 7.9 (RES 7.2). V kontrole tento nález nebyl potvrzen.

Obr. 8: Metabolit demethylovaného thunalbenu



Porovnání vlivu pufru a bakterií na množství resveratrolu a jeho metabolitu dihydroresveratrolu je znázorněn na obrázku číslo 9. Resveratrol po uplynutí fermentační doby přechází ve vzorku střevní bioty na dihydroresveratrol, zatímco samotný pufr prostý střevních bakterií tento proces nepodporuje.

Obr. 9: Resveratrol ve vzorku stolice, pufru a vznikající metabolit dihydroresveratrol



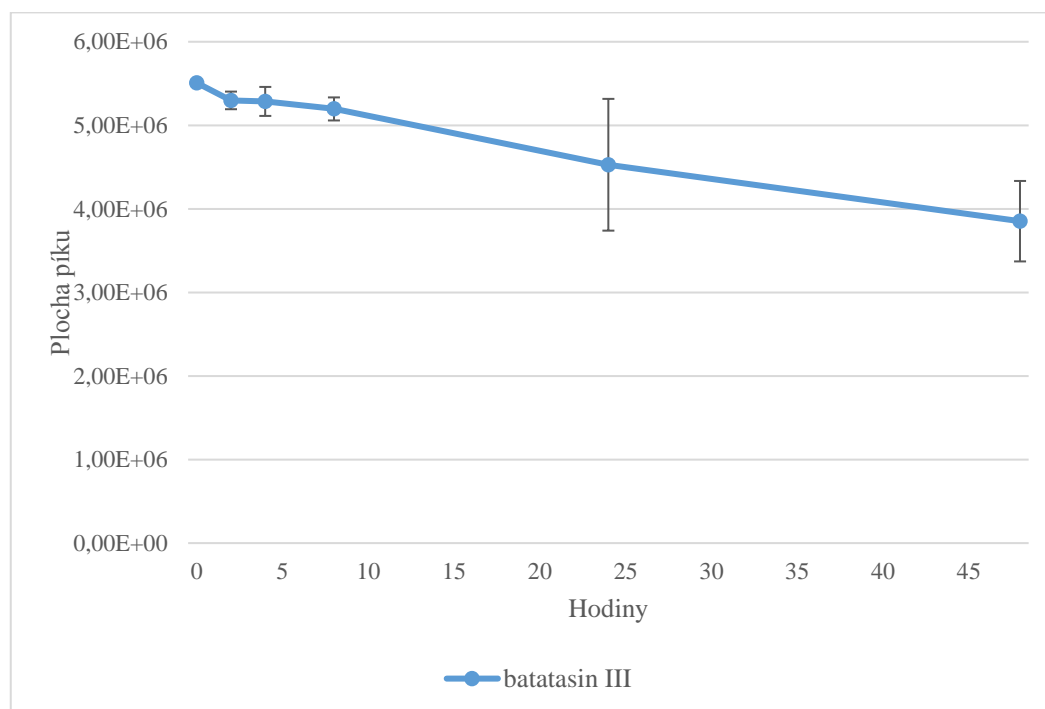
5.3 Semikvantitativní analýza

Semikvantitativní analýzou byla sledována změna intenzity detekovaných metabolitů v průběhu kultivace.

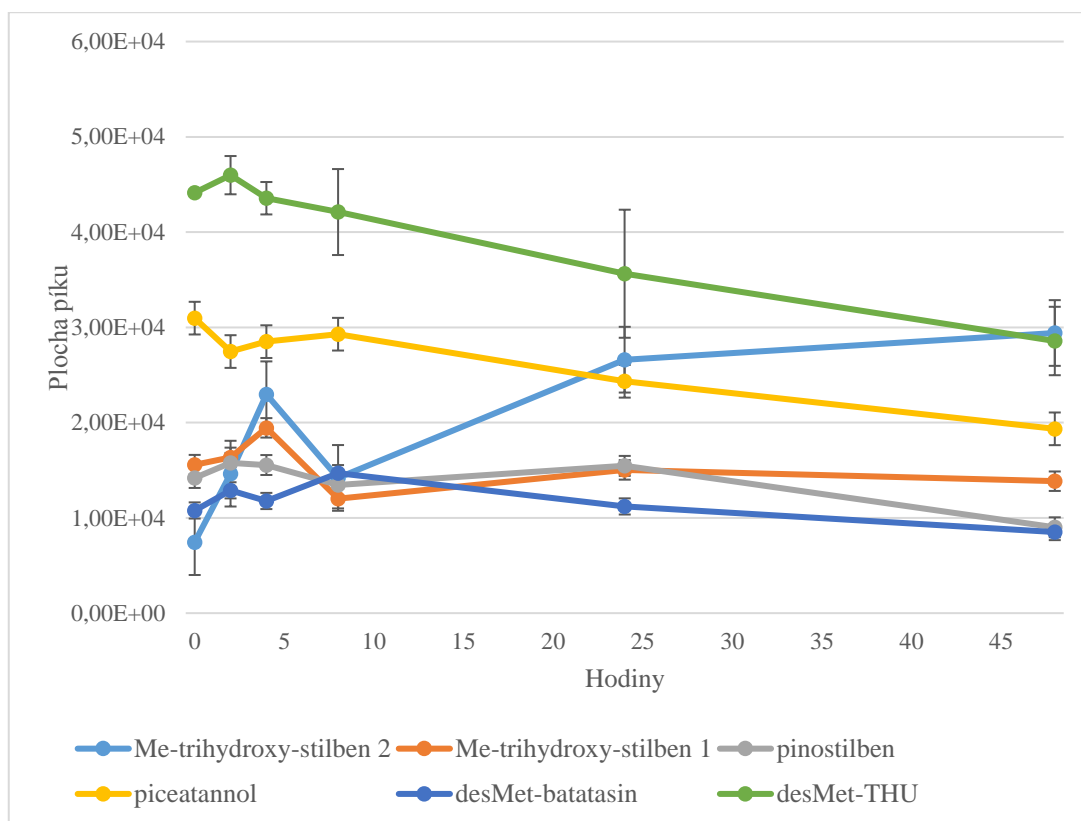
5.3.1 Batatasin III

Obrázky 10 a 11 ukazují dynamiku obsahu batatasinu III v čase. Je patrné, že docházelo nejen k úbytku samotného stilbenoidu, ale i k jeho transformaci do metabolitů. Obrázek 11 ukazuje transformaci batatasinu III na předpokládaný pinostilben, piceatannol a další 4 analoga.

Obr. 10: Úbytek batatasinu III v čase



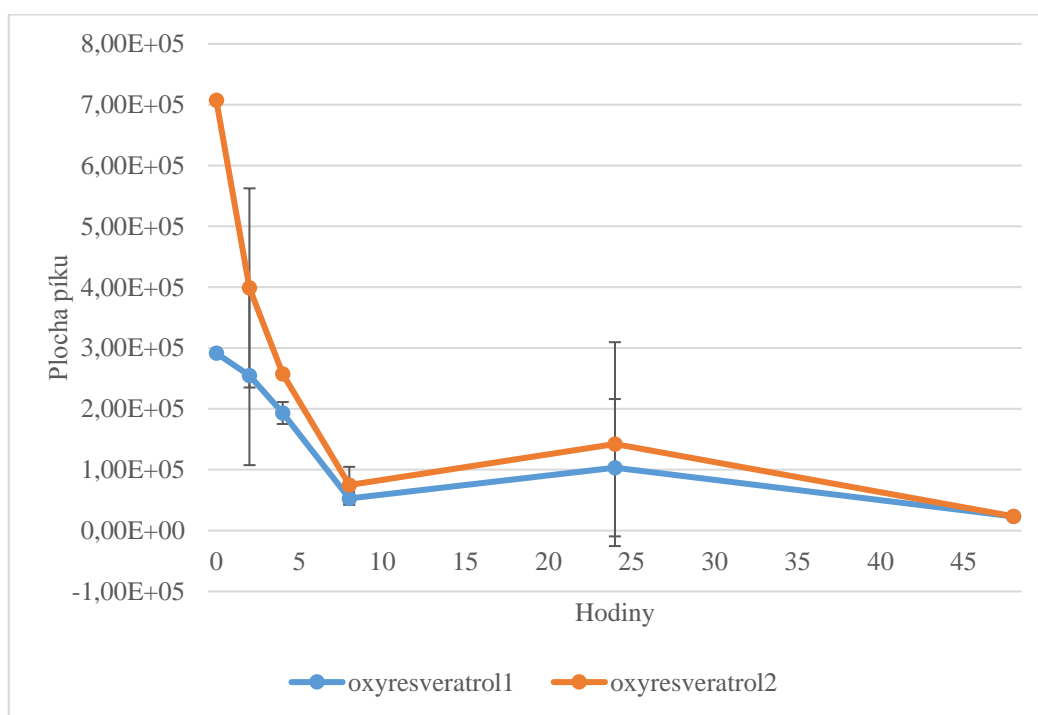
Obr. 11: Průběh koncentrací látek detekovaných ve vzorcích s přidavkem batatasinu III



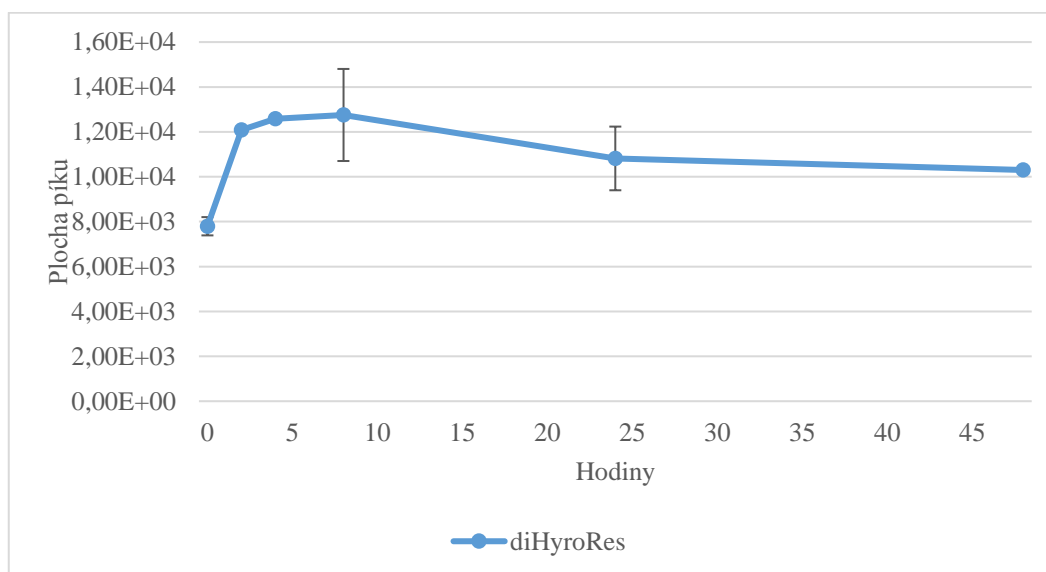
5.3.2 Oxyresveratrol

Oxyresveratrol a vznik dihydroresveratrolu je zobrazen obrázky 12 a 13. Na nich je patrné, že po 48 hodinách dojde prakticky k dokonalému odbourání výchozího substrátu za současného pozvolného nárůstu redukovaného metabolitu. Na obrázku 12 je patrný rozdíl v detekci oxyresveratrolů, jedná se o blíže nespecifikovaný tetrahydroxystilben.

Obr. 12: Metabolizace oxyresveratrolu v čase



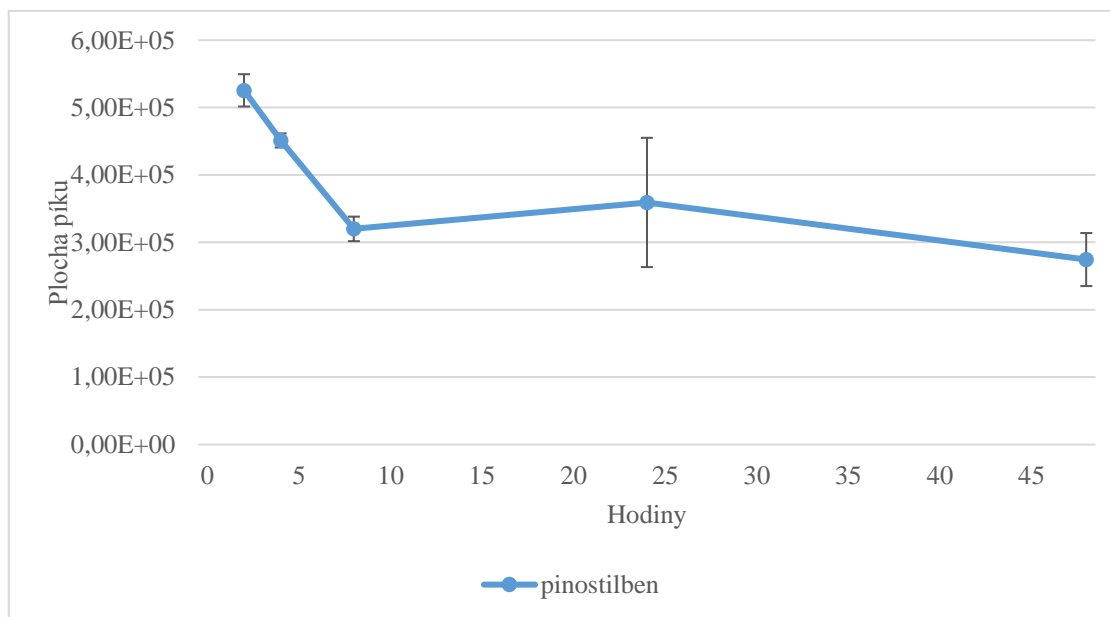
Obr. 13: Vznik metabolitu v čase



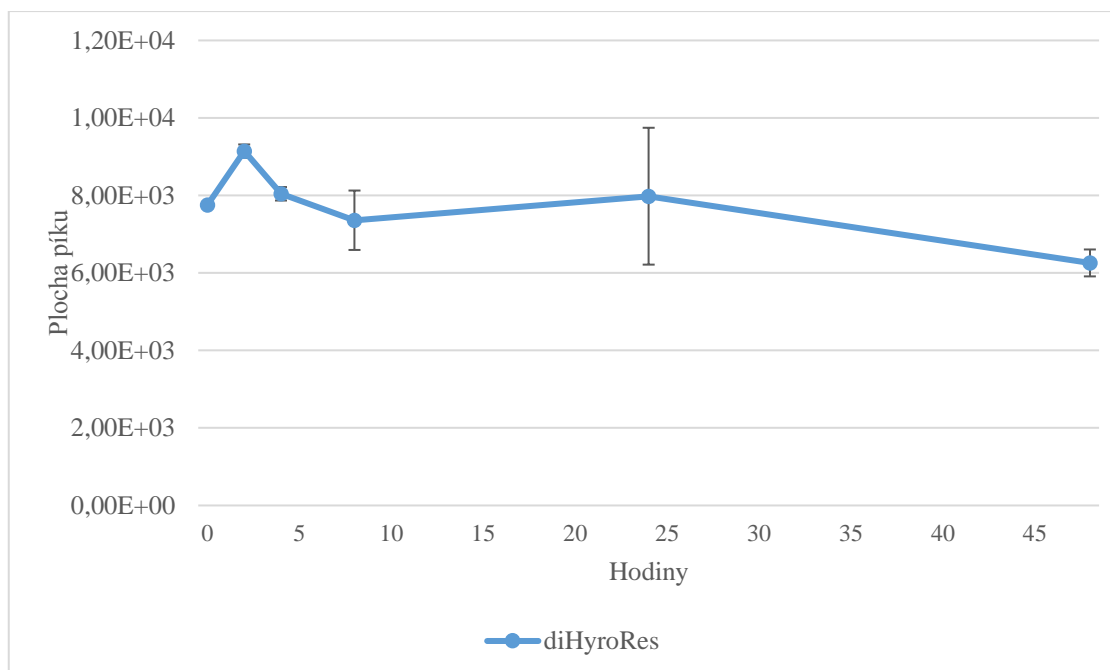
5.3.3 Pinostilben

Obrázky 14 a 15 ukazují postupný rozpad pinostilbenu v důsledku metabolizace bakteriemi a detekci dihydrostilbenu. Je patrné, že se bakteriím nepodařilo ani za 48 hodin zmetabolizovat celý pinostilben. Zároveň se dihydroresveratrol v čase příliš neměnil.

Obr. 14: Úbytek pinostilbenu v čase



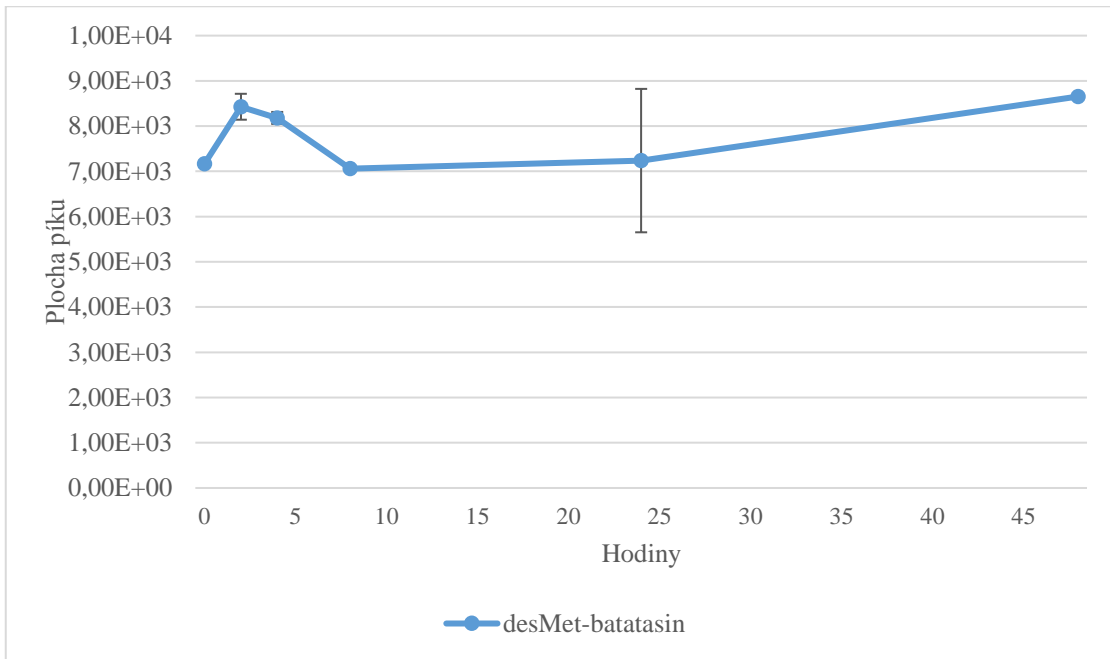
Obr. 15: Vznik a degradace předpokládaného dihydroresveratrolu v čase



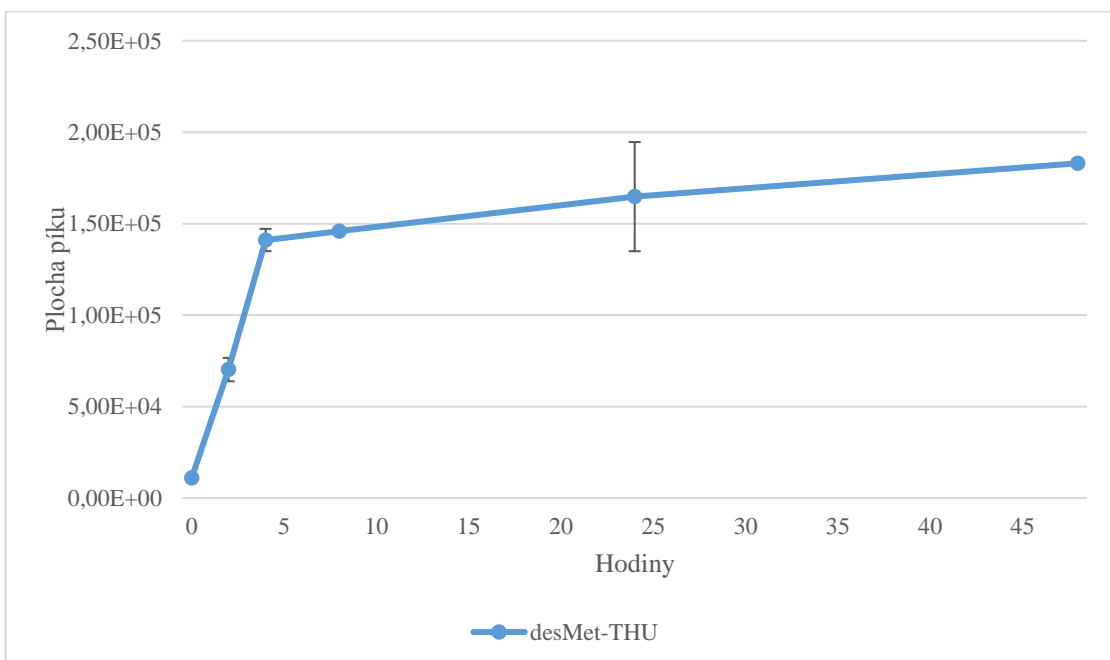
5.3.4 Thunalben

Průběh metabolismu thunalbenu je znázorněn obrázky 16 a 17. Samotný thunalben a jeho změnu v čase se nepodařilo nikde detekovat. Obrázek 16 ukazuje v čase se příliš neměnicí odezvu předpokládaného demethylovaného metabolitu. V kontrastu k tomu obrázek 17. ukazuje určitý nárůst koncentrace demethylovaného metabolitu v prvních hodinách.

Obr. 16: Nález demethylovaného produktu s dvojnou vazbou v čase



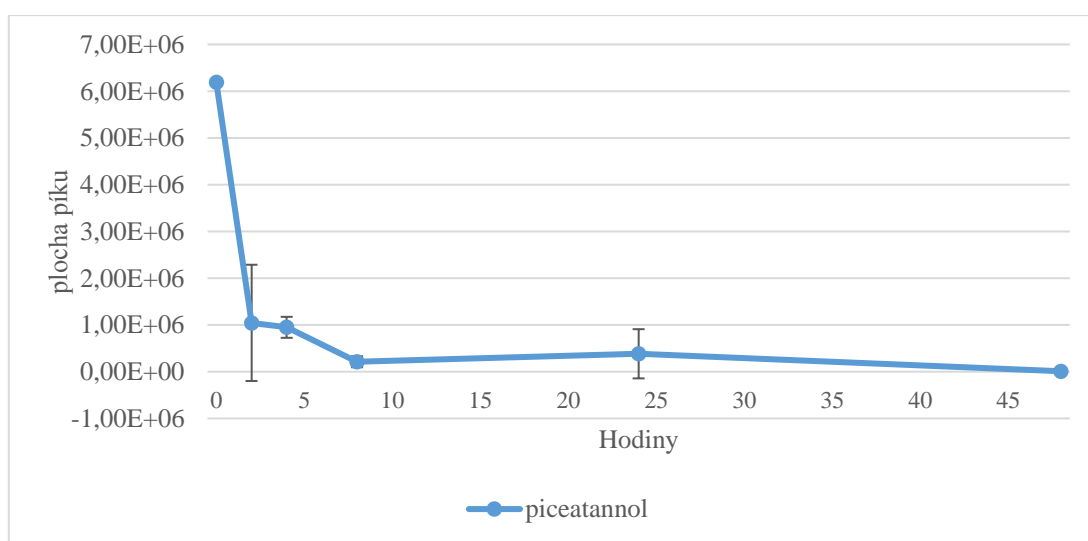
Obr. 17: Akumulace demethylovaného metabolitu v čase



5.3.5 Piceatannol-3-O-glukosid

Vzorky piceatannolu-3-O-glukosid jsou znázorněny obrázky 18, 19 a 20. Samotný PGL nebyl detekován. Největší intenzitu měl jeho deglykosylovaný analog PIC. Z obrázku 18 je patrné, že piceatannol byl intenzivně metabolizován v prvních 8 hodinách. Obrázek 19 ilustruje nárůst koncentrace metabolitu dehydrotrihydroxystilbenu, k jehož výrazné akumulaci dochází mezi 4. a 8. hodinou. Obrázek 20 pak ukazuje průběh trihydroxystilbenu jehož nárůst koresponduje se vznikem zmíněného dehydrotrihydroxystilbenu, ale o jiné intenzitě.

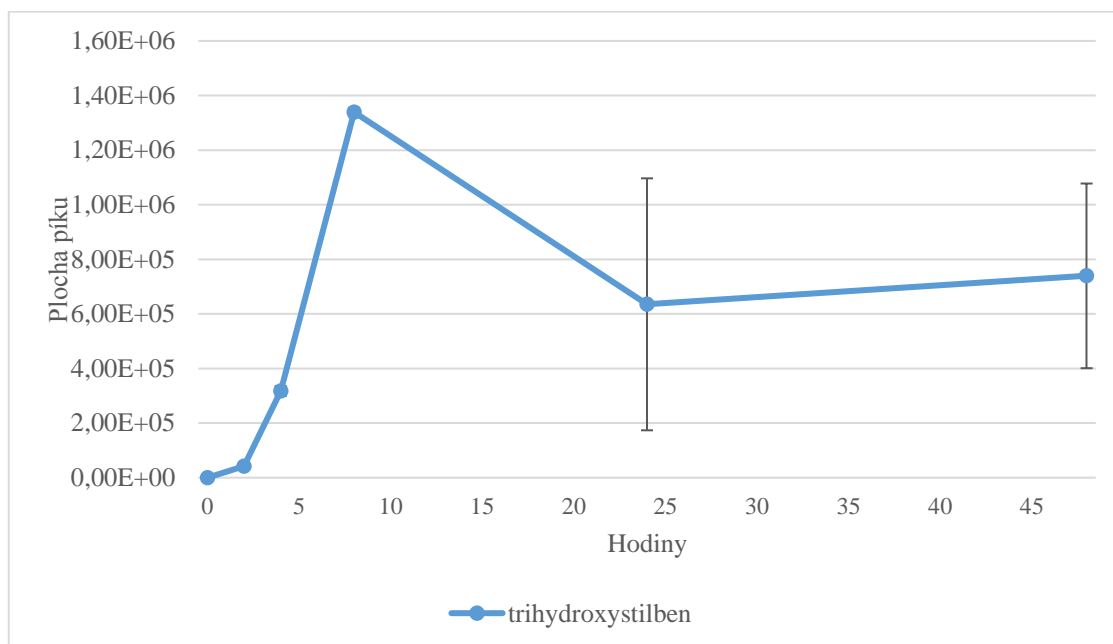
Obr. 18: Pokles metabolitu PIC v čase



Obr. 19: Vznik metabolitu redukovaného trihydroxystilbenu v čase z PGL



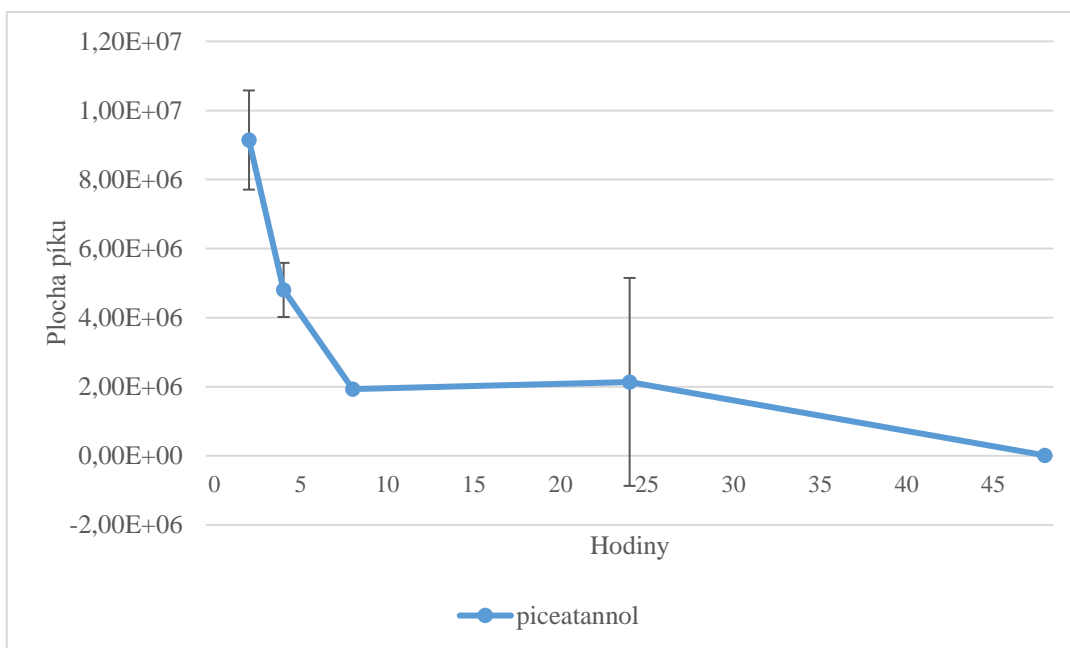
Obr. 20: Vznik trihydroxystilbenu v čase z PGL



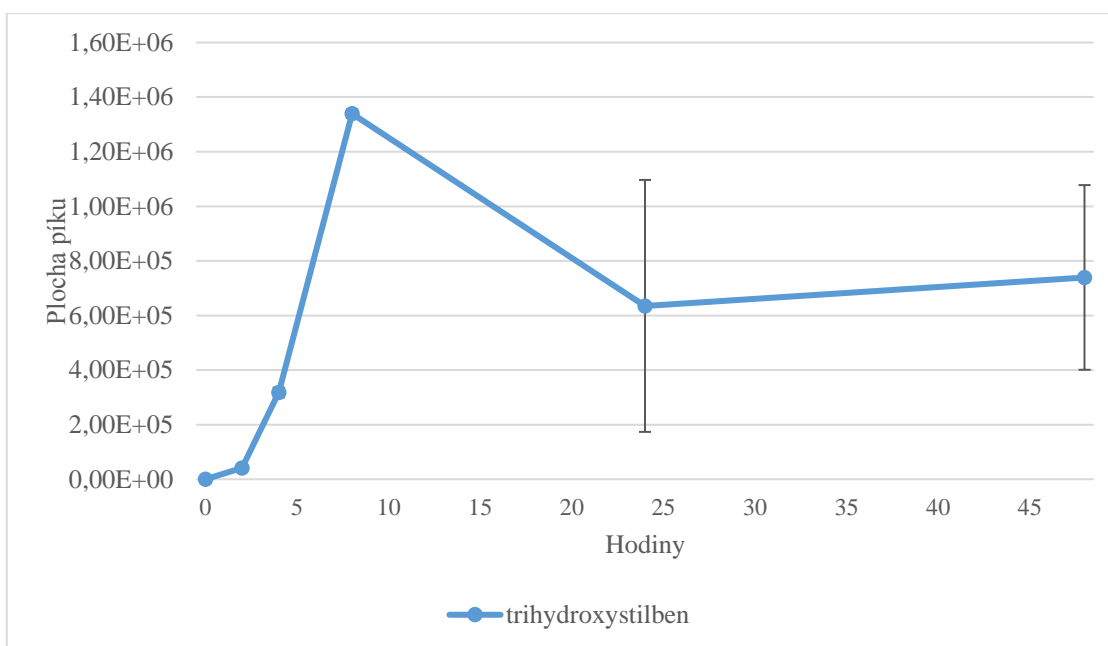
5.3.6 Piceatannol

Obrázky 21, 22 a 23 ukazují metabolismus piceatannolu za vzniku jeho dehydroxylovaných metabolitů. Piceatannol je postupně celý metabolizován a dává vzniknout resveratrolu a dihydroresveratrolu.

Obr. 20: Rozklad piceatannolu v čase



Obr. 21: Vznik neurčeného trihydroxy stilbenu v čase z PIC



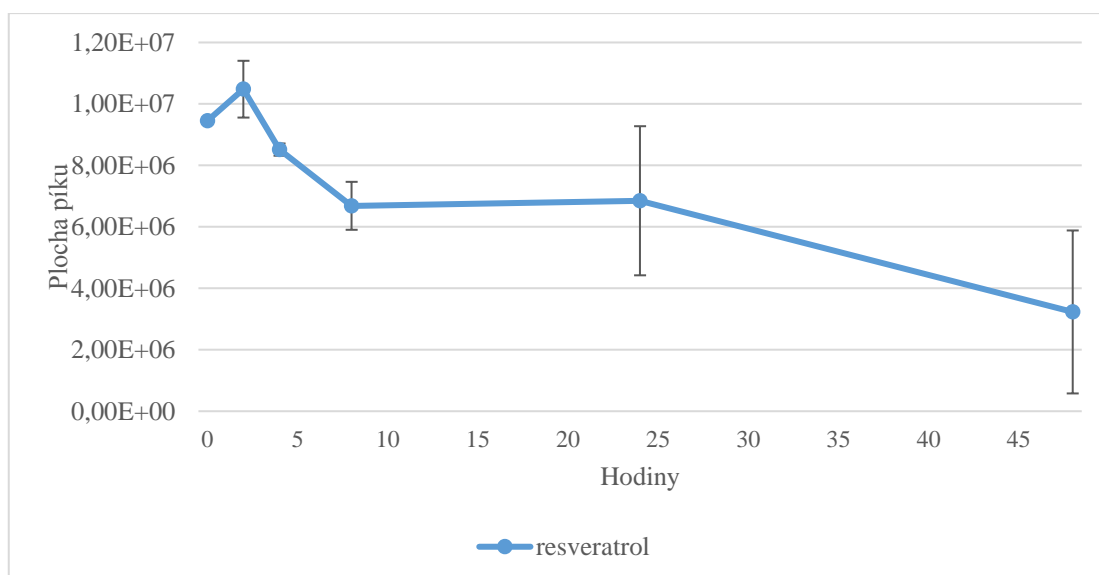
Obr. 22: Průběh akumulace redukovaného trihydroxystilbenu vznikajícího z PIC



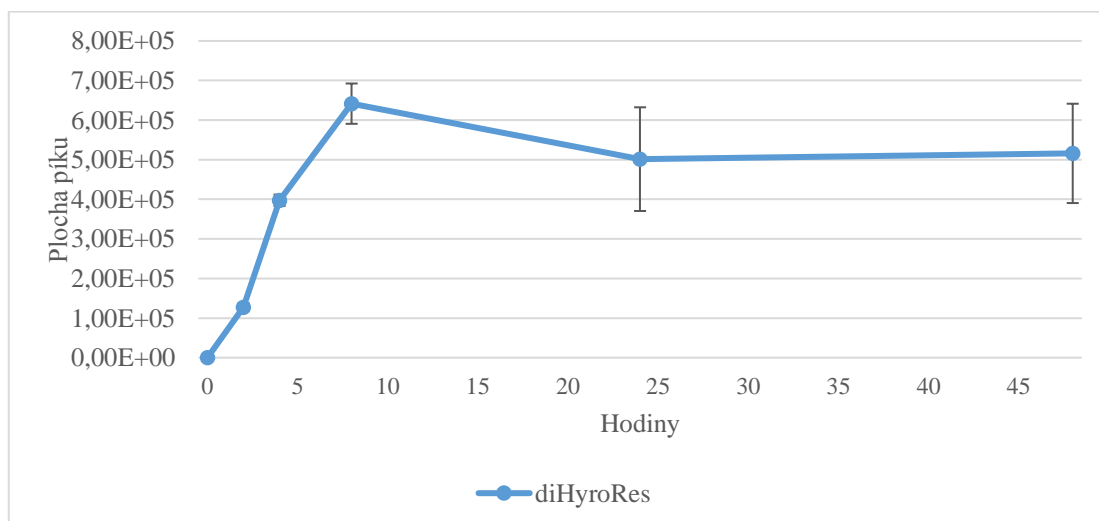
5.3.7 Resveratrol

Obrázky 23, 24, 25, 26 a 27 dokazují zapojení metabolismu mikrobioty při degradaci resveratrolu. Resveratrol je intenzivně metabolizován prvních 8 hodin, potom se rychlost jeho degradace zpomaluje. Dihydroresveratrol vzniká intenzivně prvních 8 hodin, poté jeho nárůst stagnuje. Obsah tetrahydroxystilbenu 1 (předpokládaný PIC) se vzhledem k chybě měření příliš nemění. Tetrahydroxystilben 2 má tendenci prvních 8 hodin stoupat, poté jeho produkce stagnuje. Tetrahydroxystilben 3 vzniká nejvíce v 8. hodině, poté postupně ubývá. Jediným statisticky průkazně korelovaným metabolitem ($r = -0.87$) byl v tomto experimentu dihydroresveratrol, který je dominantním produktem konverze resveratrolu bakteriemi.

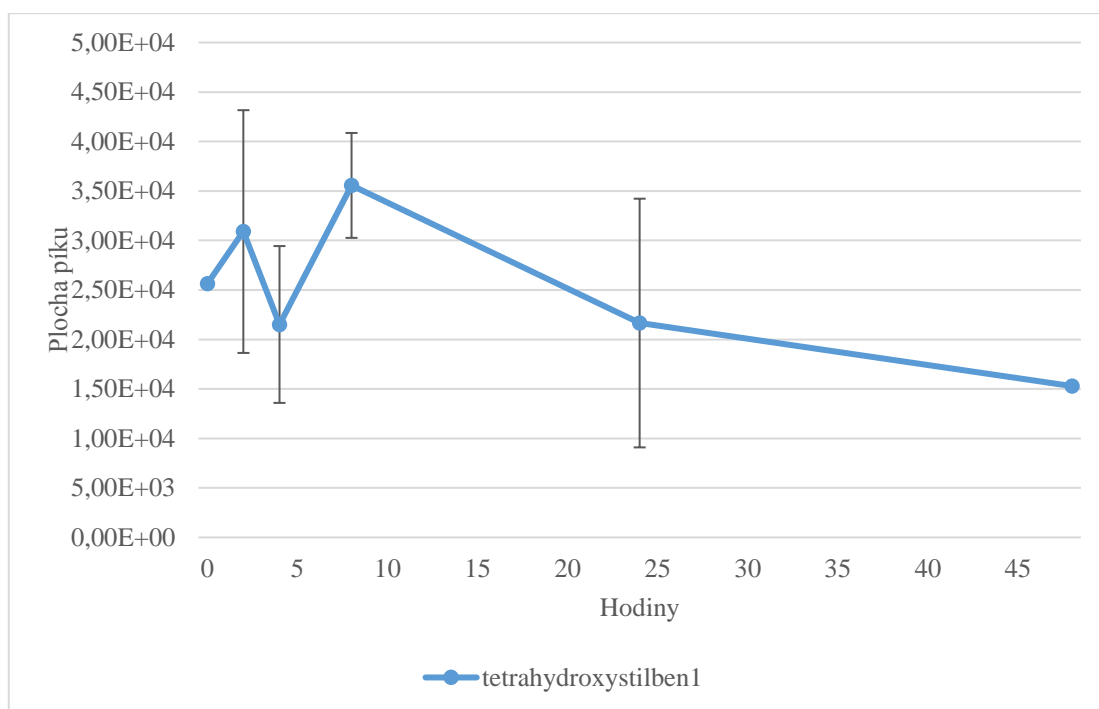
Obr. 23: Rozpad resveratrolu v průběhu času



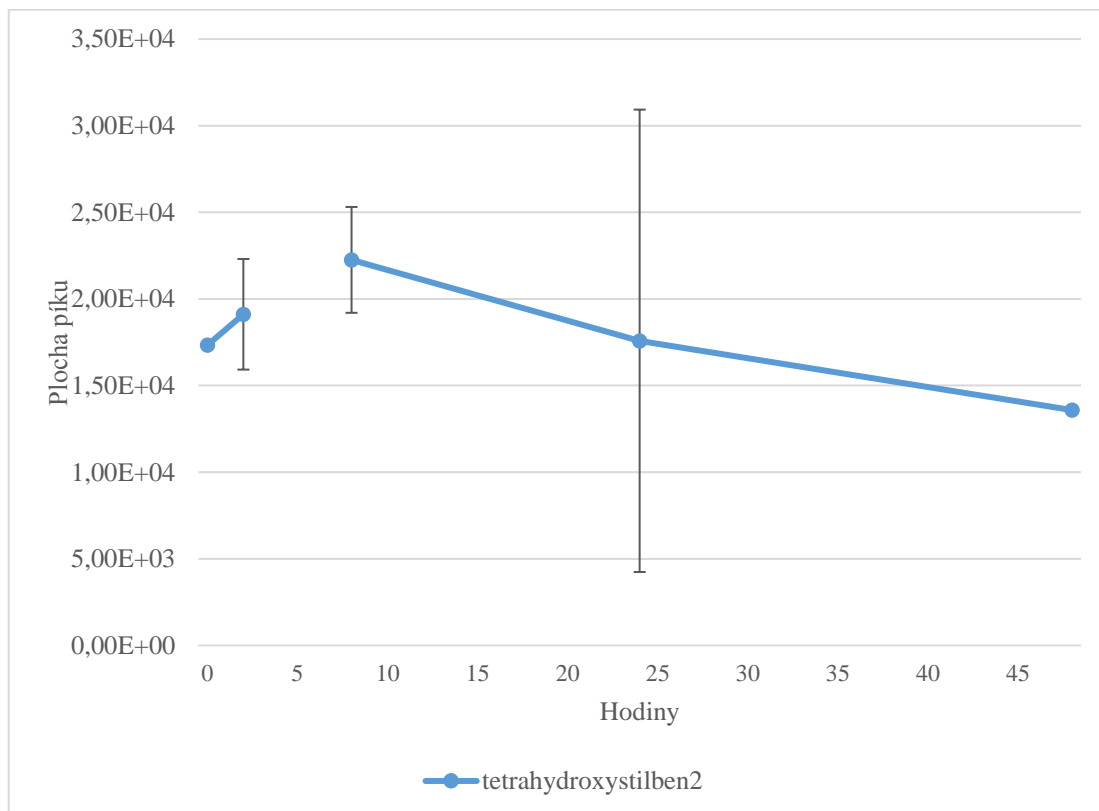
Obr. 24: Vznik předpokládaného dihydroresveratrolu v čase z RES



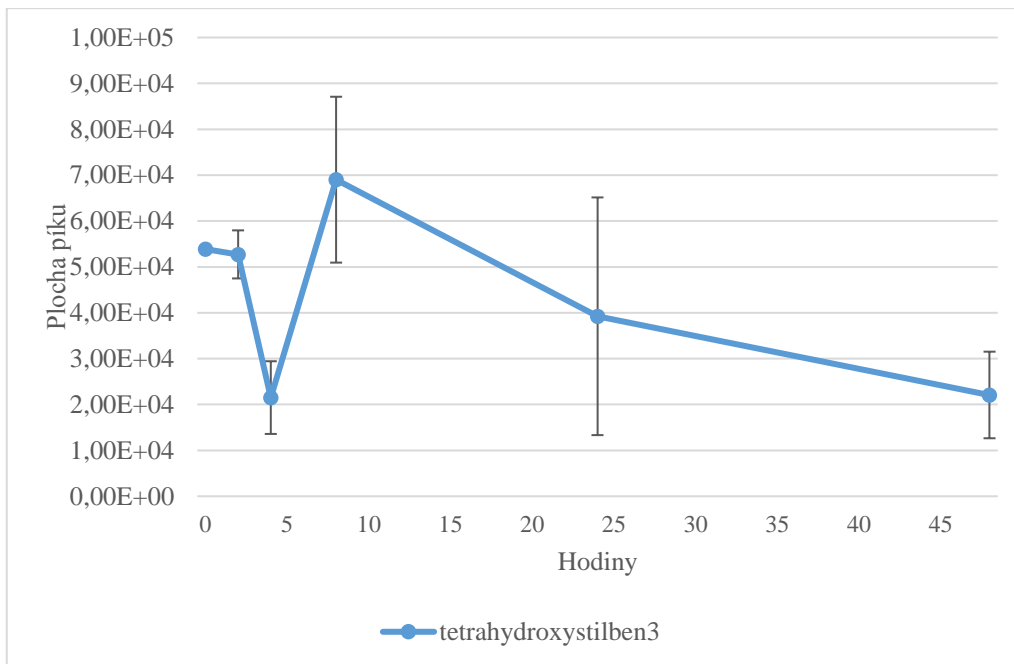
Obr. 25: Koncentrace tetrahydroxystilbenu 1 v čase



Obr. 26: Koncentrace tetrahydroxystilbenu 2 v čase



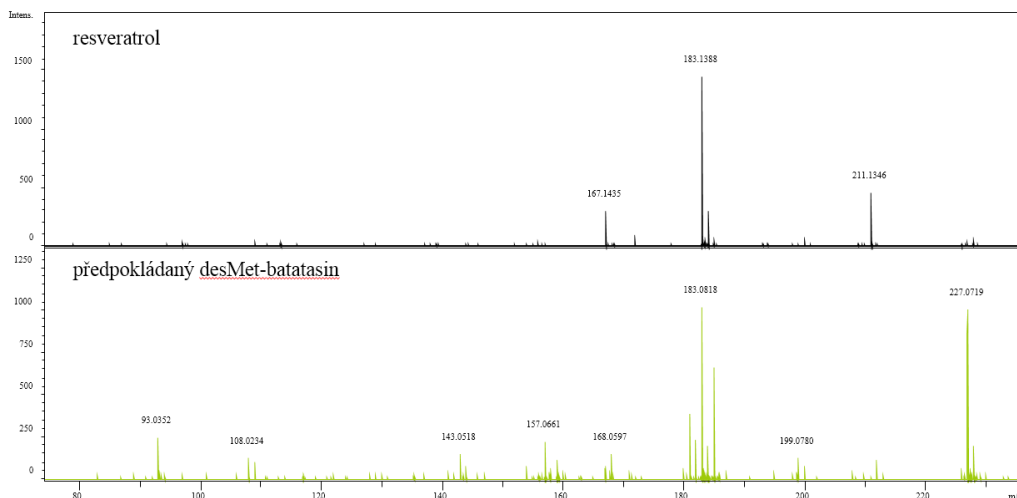
Obr. 27: Koncentrace tetrahydroxystilbenu 3 v čase



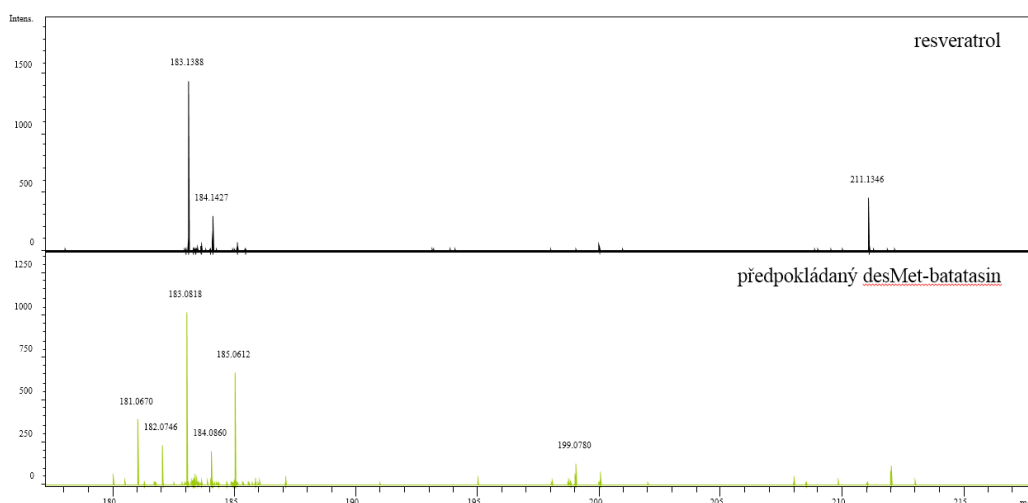
5.4 MRM

Metoda multiple reaction monitoring se použila ve sporných případech látek se stejným m/z. Metabolit demetylovaného trihydroxystilbenu s RT 7.9 a stejným m/z jako resveratrol (RT 7.2) je znázorněn na obrázcích 28 a 29, kde je zobrazen rozdíl ve složení spekter obou látek, které se v zástupu některých iontů liší jak kvantitativně, tak kvalitativně.

Obr. 28: Porovnání spekter MRM resveratrolu a demetylovaného batatasinu



Obr. 29: Porovnání spekter MRM resveratrolu a demetylovaného batatasinu.



5.5 Statistický výstup

Pro statistické ověření výsledků byl použit korelační koeficient mezi stilbenoidy a jejich vznikajícími metabolity.

5.5.1 Korelace

5.5.1.1 Korelace mezi batatasinem III a jeho metabolity

	(1)	(2)	(3)	(4)	5)	(6)	(7)
Me-trihydroxy-stilben 1	1,00	0,03	0,66	0,35	-0,01	0,46	0,44
Me-trihydroxy-stilben 2	0,03	1,00	-0,26	-0,87	-0,50	-0,77	-0,83
Pinostilben	0,66	-0,26	1,00	0,60	0,37	0,67	0,65
Piceatannol	0,35	-0,87	0,60	1,00	0,67	0,92	0,98
desMet-batatasin	-0,01	-0,50	0,37	0,67	1,00	0,70	0,67
desMet-THU	0,46	-0,77	0,67	0,92	0,70	1,00	0,98
batatasin III	0,44	-0,83	0,65	0,98	0,67	0,98	1,00

(1) Me-trihydroxy-stilben 1 (2) Me-trihydroxy-stilben 2 (3) Pinostilben (4) Piceatannol (5) desMet-batatasin (6) desMet-THU (7) batatasin III

5.5.1.2 Korelace mezi oxyresveratrolem a jeho metabolity

	(1)	(2)	(3)
oxyresveratrol1	1,00	0,62	-0,72
oxyresveratrol2	0,62	1,00	-0,05
diHyroRes	-0,72	-0,05	1,00

(1) oxyresveratrol1 (2) oxyresveratrol2 (3) diHyroRes

5.5.1.3 Korelace mezi pinostilbenem a jeho metabolity

	(1)	(2)
pinostilben	1,00	0,51
diHyroRes	0,51	1,00

(1) pinostilben (2) diHyroRes

5.5.1.4 Korelace mezi thunalbenem a jeho metabolity

	(1)	(2)
desMet-batatasin	1,00	0,24
desMet-THU	0,24	1,00

(1) desMet-batatasin (2) desMet-THU

5.5.1.5 Korelace mezi piceatannol-3-O-glukosidem a jeho metabolity

	(1)	(2)	(3)
resveratrol	1,00	-0,61	0,87
piceatannol	-0,61	1,00	-0,90
diHyroRes	0,87	-0,90	1,00

(1) resveratrol (2) piceatannol (3) diHyroRes

5.5.1.6 Korelace mezi piceatannolem a jeho metabolity

	(1)	(2)	(3)
tri-OH-stilb	1,00	-0,75	0,92
piceatannol	-0,75	1,00	-0,85
diHyro tri-OH-stilb	0,92	-0,85	1,00

(1) tri-OH-stilb (2) piceatannol (3) diHyro tri-OH-stilb

5.5.1.7 Korelace mezi resveratrolem a jeho metabolity

	(1)	(2)	(3)	(4)
resveratrol	1,00	0,68	0,60	-0,73
piceatannol1	0,68	1,00	0,97	-0,11
oxyresveratrol1	0,60	0,97	1,00	0,06
diHyroRes	-0,73	-0,11	0,06	1,00

(1) resveratrol (2) piceatannol (3) oxyresveratrol (4) diHyroRes

6 Diskuze

Pro získání co nejčistších frakcí stilbenoidů se používá několik variant purifikačních metod. Na začátku byly porovnány metody SPE a LLE. SPE s různým typem kolonek byla použita v pracích pro extrakci polyfenolů (Žiaková and Branšteterová, 2002, Pyrzynska and Biesaga, 2009 a Rotches-Ribalta et al, 2012). LLE s etyl-acetátem použili Goodrich et al. (2014). Metoda LLE za použití etyl-acetátu a vody se ukázala jako výkonnější čistící metoda oproti SPE na základě testování reprezentativního vzorku trans-resveratrolu metodou UPLC-MS, proto se LLE používala dál pro všechny stilbenoidy a od SPE se odstoupilo. K výběru etyl-acetátu jako rozpouštědla bylo přistoupeno pro jeho lepší vlastnosti, které vyplývají i ze studie Sun et al. (2008), která zaznamenává vliv délky uhlíkatého řetězce na rozpustnost.

Vzorky stilbenoidu resveratrolu prošlé simulací střevního metabolismu *in vitro* prodělaly statisticky významnou přeměnu. V retenčním čase 7.2 minuty byl resveratrol detekován a jeho intenzita postupně klesala s délkou fermentace. Tento pokles se dá vysvětlit reakcí se střevní biotou dárce, protože byl detekován metabolit dihydroresveratrol v čase 7.0, jehož množství postupem času stoupalo. Dihydroresveratrol vzniká odstraněním dvojně vazby a tento náleze je v souladu se studiemi, které provedli Juan et al. (2010) na krysách, Rotches et al. (2012b) s lidskou plazmou a Bode et al. (2013). Tento metabolismus byl nalezen u všech dárců ze studií, proto se jedná o vlastnost běžnou pro lidský mikrobiom. Bode et al. (2013) zároveň identifikovali další metabolity, mezi které patří 3,4'-dihydroxy-trans-stilben a lunularin, V případě 3,4'-dihydroxy-trans-stilbenu se jedná o molekulu s výkonnější antioxidační aktivitou (Cai et al., 2011) která vzniká odstraněním hydroxylové skupiny. Lunularin je pak molekulou, která prodělá jak oxidaci, tak dehydroxylaci. Dihydroxy-trans-stilben nebyl nalezen ani po 48 hodinách fermentace, což může být vysvětleno vlivem jednotlivého dárce, tak jak upozorňují na náleze Bode et al. (2013). Zároveň v jejich studii je popisována i malá koncentrace, která vzniká v porovnání s lunularinem. V jejich studii z celkem 7 dárců u 3 vzorků se jim nepodařilo tento metabolit detekovat, u dalších 3 zjistit jeho množství, to se povedlo pouze u jednoho dárce. Lunularin rovněž nebyl nalezen, což se dá vysvětlit zase variantou dárce, kdy na tento případ (1 ze 7) narazili Bode et al. (2013). Nicméně pro zjištění tohoto jevu bude potřeba si počkat na výsledky od dalších dárců. Jiné možné varianty změny molekuly (methylace, vícenásobná dehydroxylace apod.) nebyly detekovány.

Kvantifikace metabolitů resveratrolu od 7 dárců ze studie Bode et al. (2013) se pohybovala mezi 0-86.9 $\mu\text{mol/L}$ pro dihydroresveratrol. 0-11.1 $\mu\text{mol/L}$ Dihydroxy-trans-

stilbenu a 0-79.8 $\mu\text{mol/L}$ pro lunularin. Použili metodu HPLC/UV-VIS a MS/MS a za pomoci PCR identifikovali 2 kmeny actinobakterií produkující dihydroresveratrol *Slackia equolifaciens* a *Adlercreutzia equolifaciens*. Finální koncentrace použitého trans-resveratrolu u nich byla 80 $\mu\text{mol/L}$.

Frakce thunalbenu v průběhu fermentace střevní biotou podstoupila proces demethylace, čímž vznikla molekula trihydroxystilbenu. Tento posun byl identifikován po 48 hodinách fermentace bakteriemi s nábojem m/z shodným s resveratrolem a s tím rozdílem, že došlo k posunu retenčního času (tj. resveratrol s RT 7.2 oproti metabolitu thunalbenu s RT 7.9). Tento posun v retenčním čase by se snad dal vysvětlit zdržením v koloně v důsledku změny tvaru molekuly, a tedy ovlivnění polariry směrem k polaritě nižší. Samotný thunalben nebyl ovšem detekován. Důvod, proč nebyl detekován, není zřejmý. Je možné, že samotný thunalben má nízkou rozpustnost, a tak se nemusel do výsledného měřeného alikvotu převést. Rozpustnost thunalbenu dle stránek ChemFaces je přibližně 1mg/ 4.1 mL pro DMSO oproti resveratrolu, který se rozpouští 1mg/ 4.3 mL pro DMSO (ChemFaces, 2017). Dle internetových stránek ChemFaces, odkud vzorek thunalbenu pochází, je rozpustnost resveratrolu a thunalbenu přibližně totožná, proto je tato možnost nepravděpodobná.

Batatasin III byl detekován ve všech časových odběrech s RT 7.9 a postupně ubýval. Byl identifikován metabolit o stejném m/z jako resveratrol. Při provedené MS/MS fragmentace nedošlo k potvrzení, že by se jednalo se jednalo o resveratrol, protože složení spekter se lišilo v zástupu fragmentů kvalitativně i kvantitativně. MS/MS porovnání našich spekter resveratrolu odpovídá fragmentaci, kterou použili Bode et al. (2013) s tím rozdílem, že deprotonavý resveratrol měl hodnoty m/z dominantních iontů 227, 185 (ztráta $-\text{CH}=\text{COH}$) a 143 (ztráta $-\text{CH}=\text{COH}$). V porovnání s demethylovaným trihydroxystilbenem jsou k nalezení 227, vysoce podobný 183 a 143, ale jejich intenzita se liší. Navíc v případě 143 se nejedná o hlavní iont a jeho intenzita je mnohonásobně menší, než v případě hlavních iontů. Předpokládáme, že se jedná o jiný způsob fragmentace a tedy že se jedná o jinou přesně nedefinovanou látku. 183 je identifikován jako $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{O}$ (Stella et al., 2008)

Piceatannol byl detekován na začátku v RT 6.8 a 6.7 (což je možné vysvětlit posunem retence v průběhu analýzy) a postupně ubýval. V posledním dni detekován nebyl, což odpovídá studii (Furuya and Kino, 2014). Byly detekovány metabolity dehydroxylace a oxidace. Produkt oxidace dvojně vazby byl identifikován v RT 6.5 minut, dehydroxylace 7.3 a dehydroxylace s oxidací dvojně vazby RT 7.2. Intenzita obou posledních produktu postupem času vzrůstala, intenzivnější byla pro bez dvojně vazby a odstraněným hydroxylem. Tyto produkty by mohly

být resveratrol a dihydroresveratrol, protože střevní biota je schopna tento proces přeměny podporovat, jako je v případě *E. coli* (Furuya et al., 2015).

U pinostilbenu nebyl prokázán žádný metabolit, jeho intenzita pozvolna klesala v RT 7.7. Oxyresveratrol byl identifikován v RT 6.3, nicméně se nepodařilo najít žádnou proběhlou reakci. Pinostilbenosid a Piceatanol-3-O-glukosid nebyly identifikovány. Zároveň nebyl detekován žádný metabolit. Pro nedostatek důkazů lze jenom spekulovat, co zapříčinilo tento jev v předběžném screeningu.

Semikvantitativní analýzou byly sledovány změny v obsahu stilbenoidů v čase podobně. Obdobně postupovali Bode et al. (2013). Metabolismus batatasinu probíhal kontinuálně a dával vzniknout pravděpodobně dvěma methylovaným sloučeninám s třemi hydroxyly, piceatannolu, demethylovanému thunalbenu a demethylovanému batatasinu, tedy probíhaly procesy demethylace, dehydroxylace a oxidace dvojně vazby. Tyto sloučeniny zjevně neovlivňovaly rychlost bakteriální degradace batatasinu.

Oxyresveratrol a jemu podobný neznámý tetrahydroxystilben byly z většiny spotřebovány bakteriemi již v prvních 8 hodinách, čímž připomíná metabolismus resveratrolu (Bode et al. 2013). Jediný produkt fermentace oxyresveratrolu byl pravděpodobný dihydroresveratrol, jehož obsah měřený plochou píku dosáhl vrcholu mezi 4. a 8. hodinou fermentace a poté se postupně pomalu snižovala.

Pinostilben po 8 hodinách fermentace dosáhl vrcholu fermentace a poté již nedocházelo k jeho konverzi. To by bylo možné vysvětlit tím, že nějaký produkt pinostilbenu inhibuje metabolizující biotu. Pro ověření této hypotézy by bylo třeba provést antimikrobiální testy tohoto stilbenoidu. V malém množství pinostilben doprovázel další trihydroxystilben, pravděpodobně dihydroresveratrol (Furuya et al., 2015). Ten vzhledem ke své koncentraci nebude mít vliv na inhibici fermentace, protože jeho množství je od počátečních hodin prakticky stabilní a vztaženo k pinostilbenu má obdobnou rychlost odbourání.

Thunalben nebylo možné detekovat, ale jeho metabolity ano. Předpokládaný demethylovaný thunalben prudce narůstal v prvních 4 hodinách fermentace, poté se jeho akumulace prudce zpomalila, přesto stále pokračovala. V kontrastu s tímto metabolitem měřená intenzita odpovídající jeho analogu demethylovanému batatasinu zpočátku pomalu klesala na intenzitě, nicméně ve vzdálenějších časových intervalech opětovně narůstala. Obsah obou metabolitů tak při déle trvající fermentaci narůstal.

Piceatanol-3-O-glukosid detekován nebyl, od počátku byl ve vzorcích přítomen pravděpodobně piceatannol, jehož intenzita postupně klesala a v následujících 8 hodinách fermentace dosáhla mezí detekce. Postupně se utvářely pravděpodobné metabolity resveratrol

a dihydroresveratrol přibližně stejno rychlostí, ale v odlišném množství ve prospěch dihydroresveratrolu. Je možné, že se dihydroresveratrol utvářel až ze samotného resveratrolu (Tsang et al., 2016). Vrchol akumulace obou metabolitů byl zaznamenán v 8. hodině kultivace, poté postupně jeho intenzita slábla.

Intenzita odezvy piceatannolu prudce klesala s přibývajícimi hodinami fermentace bakteriemi, až do 48. hodiny, kde ho nebylo možné nadále detekovat. Společně s ním byly identifikovány 2 metabolity. Trihydroxystilben postupně vznikal do maxima v 8 hodinách fermentace, postupně pak na intenzitě klesal. Jeho redukovaná varianta dosáhla maxima obdobně v 8 fermentace, postupně pak ubývala. Může se jednat o resveratrol a dihydroresveratrol (Furuya and Kino, 2014). Průběh křivek významně připomíná metabolity PGL. Toto naznačuje, že piceatannol-3-O-glukosid je deglykosylován a posléze metabolizace jeho stilbenoidního skeletu probíhá stejně jako u PIC.

Nejintenzivnější odezvu z metabolitů resveratrolu měl dihydroresveratrol. Ten během prvních 8 hodin bakteriální fermentace dosáhl svého maxima a jeho intenzita se další časové odběry udržovala na konstantní úrovni. V ten samý čas došlo (8. hodina) i ke zpomalení metabolizace resveratrolu. Pravděpodobně tak v tomto čase dochází k nasycení enzymatického systému bakterií redukujících dvojnou vazbu u resveratrolu, a tak probíhá tvorba dihydroresveratrolu stabilní rychlostí. Tento nález je totožný s (Bode et al., 2013). 8 hodin je zároveň vrcholem akumulace i u dalších metabolitů resveratrolu, jakými jsou ostatní 3 tetrahydroxystilbeny. Jedním z nich bude pravděpodobně piceatannol (Furuya et al., 2015). Je otázkou, zda dihydroresveratrol nebo metabolit(y) tetrahydroxystilben(ů) nevytváří negativní zpětnou vazbu, kterou by zpomalily rychlost metabolismu resveratrolu. Pro více informací bude potřeba provést porovnání s dalšími dárči.

7 Závěr

Tato diplomová práce si dala za cíl prozkoumat metabolismus stilbenoidních látek v modelu tlustého střeva dárce držící bezpolyfenolovou dietu in vitro a ověřit hypotézu, že konečnými produkty bakteriální fermentace budou monocyklické sloučeniny.

K získání výsledků byla použita analýza pomocí UPLC-Q-TOF a ty byly poté předběžně interpretovány pomocí softwaru Metabolite Detect 2.0 SR 4 a výstupní data byla nakonec zpracována programem DataAnalysis 4.3 a TASQ 2.2.

Z 8 vzorků stilbenoidů bylo zaznamenáno celkem „19“ metabolitů dehydroxylace, oxidace dvojných vazby a demethylace, nicméně některé metabolity mohly být od začátku přítomny jako nečistoty. Štěpení centrálního ethenového můstku nebylo v rámci této studie pozorováno. Nejvíce vzniklých metabolitů bylo detekováno ze stilbenoidů batatasinu a resveratrolu. Nejčastějším typem reakce byla redukce centrální ethenové dvojných vazby, která byla zjištěna u vzorků trans-resveratrolu, oxyresveratrolu, pinostilbenu, piceatannol-3-O-glukosidu a piceatannolu. Dalšími typy reakcemi byla v případě přítomnosti methoxy- skupin v molekule její demethylace a ztráta hydroxylových skupin. Tyto metabolické reakce pravděpodobně silně závisí na umístění hydroxylových skupin, a to i v případě ethenového můstku, neboť probíhaly selektivně pouze u některých testovaných sloučenin.

Výsledky tohoto experimentu potvrzují, že střevní biota metabolizuje sledované stilbenoidy podobným mechanismem a většina produktů vzniká v prvních hodinách fermentace. Vzhledem k rychlosti posunu tráveniny lidským trávicím traktem je potřeba pro další výzkum vzít v úvahu, že metabolismus balastních látek probíhá spíše v proximální části tlustého střeva, kde složení střevní mikrobioty nemusí nutně odpovídat distálnějšími úsekům, a tudíž mohou být vzniklé produkty odlišné jak kvantitativně, tak kvalitativně.

8 Použitá literatura

- Adlercreutz, H., K. Höckerstedt, C. Bannwart, S. Bloigu, E. Hämäläinen, T. Fotsis and A. Ollus 1987 Effect of dietary components, including lignans and phytoestrogens, on enterohepatic circulation and liver metabolism of estrogens and on sex hormone binding globulin (SHBG). *Journal of steroid biochemistry* **27**(4-6): 1135-1144.
- Adrian, M., P. Jeandet, J. Veneau, L. A. Weston and R. Bessis 1997. Biological activity of resveratrol, a stilbenic compound from grapevines, against *Botrytis cinerea*, the causal agent for gray mold. *Journal of Chemical Ecology* **23**(7): 1689-1702.
- Aldoori, W. H., E. L. Giovannucci, M. J. Stampfer, E. B. Rimm, A. L. Wing and W. C. Willett 1997. Prospective study of diet and the risk of duodenal ulcer in men. *American journal of epidemiology* **145**(1): 42-50.
- Balch, J. and Balch P. 1997. Prescription for Nutritional Healing. A practical AZ reference to Drug Free Remedies using vitamins, minerals, herbs, and food supplements, Avery Publishing Group, Garden City Park, New York. New York. 566 s. ISBN: 978-1583334003
- Baur, J. A., K. J. Pearson, N. L. Price, H. A. Jamieson, C. Lerin, A. Kalra, V. V. Prabhu, J. S. Allard, G. Lopez-Lluch and K. Lewis 2006. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* **444**(7117): 337-342.
- Baur, J. A. and D. A. Sinclair 2006. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nature reviews Drug discovery* **5**(6): 493-506.
- Berrueta, L. A., B. Gallo, and F. Vicente 1995. A review of solid phase extraction: basic principles and new developments. *Chromatographia* **40**:7-8: 474-483.
- Bibby, B. G. and M. Van Kesteren 1940. The effect of fluorine on mouth bacteria. *Journal of Dental Research* **19**(4): 391-402.
- Blaut, Schoefer, and Braune 2007. Transformation of flavonoids by intestinal microorganisms. *International journal for vitamin and nutrition research* **73.2** (2003): 79-87.
- Blaut, M. and T. Clavel 2007. Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implications for health and disease. *The Journal of nutrition* **137**(3): 751S-755S.
- Bode, Lisa M. 2010 In vivo and in vitro metabolism of trans-resveratrol by human gut microbiota. *The American journal of clinical nutrition* **97.2** (2013): 295-309.
- Bronský, M. J. 2010. Mateřské mléko jako zdroj bakterií s potenciálně probiotickými účinky. *Pediatrica pre prax*: 156-158.
- Burkitt, D. P. 1973. Epidemiology of large bowel disease: the role of fibre. *Proceedings of the Nutrition Society* **32**(03): 145-149.
- Cai, Wenqing, et al. 2011 3, 4, 4'-Trihydroxy-trans-stilbene, an analogue of resveratrol, is a potent antioxidant and cytotoxic agent. *Free radical research* **45.11-12**: 1379-1387.
- Cani, P. D., R. Bibiloni, C. Knauf, A. Waget, A. M. Neyrinck, N. M. Delzenne and R. Burcelin 2008. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* **57**(6): 1470-1481.
- Catalgol, B., S. Batirel, Y. Taga and N. K. Ozer 2012. Resveratrol: French paradox revisited. *Frontiers in pharmacology* **3**: 141.
- Chachay, V. S., C. M. J. Kirkpatrick, I. J. Hickman, M. Ferguson, J. B. Prins and J. H. Martin 2011. Resveratrol—pills to replace a healthy diet? *British journal of clinical pharmacology* **72**(1): 27-38.
- ChemFaces 2017 Calculate Dilution Ratios
dostupné z: <http://www.chemfaces.com/natural/Thunalbene-CFN92783.html>

- Chen, Y. F., et al. 2008 Cyclooxygenase-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drugs (etodolac, meloxicam, celecoxib, rofecoxib, etoricoxib, valdecoxib and lumiracoxib) for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: a systematic review and economic evaluation.
- Chen, X., E. Mukwaya, M.-S. Wong and Y. Zhang 2014. A systematic review on biological activities of prenylated flavonoids. *Pharmaceutical biology* **52**(5): 655-660.
- Cichewicz, R. H. and S. A. Kouzi 1998. Biotransformation of resveratrol to piceid by *Bacillus cereus*. *Journal of natural products* **61**(10): 1313-1314.
- Cooper, B. A. and W. B. Castle 1960. Sequential mechanisms in the enhanced absorption of vitamin B12 by intrinsic factor in the rat. *Journal of Clinical Investigation* **39**(1): 199.
- Crook, W. G. 1983. *The Yeast Connection: A Medical Breakthrough*. PO Box 3494, Jackson, TN 38301, Professional Books.
- Culpitt, S. V., D. F. Rogers, P. S. Fenwick, P. Shah, C. De Matos, R. E. K. Russell, P. J. Barnes and L. E. Donnelly 2003. Inhibition by red wine extract, resveratrol, of cytokine release by alveolar macrophages in COPD. *Thorax* **58**(11): 942-946.
- Cummings, J. H. and H. N. Englyst 1991. Measurement of starch fermentation in the human large intestine. *Canadian journal of physiology and pharmacology* **69**(1): 121-129.
- Docherty, J. J., M. M. H. Fu, B. S. Stiffler, R. J. Limperos, C. M. Pokabla and A. L. DeLucia 1999. Resveratrol inhibition of herpes simplex virus replication. *Antiviral research* **43**(3): 145-155.
- Donnez, David, et al. 2009 Bioproduction of resveratrol and stilbene derivatives by plant cells and microorganisms. *Trends in biotechnology* **27**.12: 706-713.
- Edreva, A., V. Velikova, T. Tsonev, S. Dagnon, A. Gürel, L. Aktaş and E. Gesheva 2008. Stress-protective role of secondary metabolites: diversity of functions and mechanisms. *Gen Appl Plant Physiol* **34**(1-2): 67-78.
- Englyst, H., H. S. Wiggins and J. H. Cummings 1982. Determination of the non-starch polysaccharides in plant foods by gas-liquid chromatography of constituent sugars as alditol acetates. *Analyst* **107**(1272): 307-318.
- Englyst, H. N. and J. H. Cummings 1985. Digestion of the polysaccharides of some cereal foods in the human small intestine. *The American journal of clinical nutrition* **42**(5): 778-787.
- Epstein, F. H., P. J. Barnes and M. Karin 1997. Nuclear factor- κ B—a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *New England Journal of Medicine* **336**(15): 1066-1071.
- Epstein, F. H. and R. Ross 1999. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *New England journal of medicine* **340**(2): 115-126.
- Ferrières, J. 2004. The French paradox: lessons for other countries. *Heart* **90**(1): 107-111.
- Francisco, Maria Leonora Lotis D., and A. V. A. Resurreccion 2009. Total phenolics and antioxidant capacity of heat-treated peanut skins. *Journal of Food Composition and Analysis* **22**.1 (2009): 16-24.
- Forester, S. C. and A. L. Waterhouse 2009. Metabolites are key to understanding health effects of wine polyphenolics. *The Journal of nutrition* **139**(9): 1824S-1831S.
- Frémont, L. 2000. Biological effects of resveratrol. *Life sciences* **66**(8): 663-673.
- Furuya, Toshiki, and Kuniki Kino. 2014 Regioselective synthesis of piceatannol from resveratrol: catalysis by two-component flavin-dependent monooxygenase HpaBC in whole cells. *Tetrahedron Letters* **55**.17: 2853-2855.
- Furuya, Toshiki, Masahiko Sai, and Kuniki Kino. 2016 Biocatalytic synthesis of 3, 4, 5, 3', 5'-pentahydroxy-trans-stilbene from piceatannol by two-component flavin-dependent monooxygenase HpaBC. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **80**.1: 193-198.
- Gagnon, N., C. Côrtes, D. da Silva, R. Kazama, C. Benchaar, G. dos Santos, L. Zeoula and H. V. Petit 2009. Ruminant metabolism of flaxseed (*Linum usitatissimum*) lignans to the

- mammalian lignan enterolactone and its concentration in ruminal fluid, plasma, urine and milk of dairy cows. *British Journal of Nutrition* **102**(07): 1015-1023.
- Goodrich, Katheryn M., and Andrew P. Neilson 2014. Simultaneous UPLC–MS/MS analysis of native catechins and procyanidins and their microbial metabolites in intestinal contents and tissues of male Wistar Furth inbred rats. *Journal of Chromatography B* **958**: 63-74.
- Hao, W.-L. and Y.-K. Lee 2004. Microflora of the gastrointestinal tract: a review. *Public Health Microbiology: Methods and Protocols*: 491-502.
- Hill, M. J. 1984 Influence of nutrition on the intestinal flora.
- Holecek, V. 2016. Regulace metabolismu základních živin u člověka, Karolinum.
- Holzappel, W. H., P. Haberer, J. Snel, U. Schillinger and J. H. J. H. in't Veld 1998. Overview of gut flora and probiotics. *International journal of food microbiology* **41**(2): 85-101.
- Hood, S. K. and E. A. Zoitola 1988. Effect of low pH on the ability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cells. *Journal of Food Science* **53**(5): 1514-1516.
- Hořejší, V. and J. Bartůňková 2009 *Základy imunologie*. 4. vydání. Praha: TRITON. 316 s, ISBN 978-80-7387-280-9.
- Hulcr, J., A. M. Latimer, J. B. Henley, N. R. Rountree, N. Fierer, A. Lucky, M. D. Lowman and R. R. Dunn 2012. A jungle in there: bacteria in belly buttons are highly diverse, but predictable. *PLoS One* **7**(11): e47712.
- Hung, L.-M., J.-K. Chen, S.-S. Huang, R.-S. Lee and M.-J. Su 2000. Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Cardiovascular research* **47**(3): 549-555.
- Hunt, T. 1963. Environment and gastrointestinal disease. *Archives of Environmental Health: An International Journal* **6**(2): 188-209.
- Huseini, H. F., B. Larijani, R. a. Heshmat, H. Fakhrzadeh, B. Radjabipour, T. Toliat and M. Raza 2006. The efficacy of *Silybum marianum* (L.) Gaertn.(silymarin) in the treatment of type II diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial. *Phytotherapy research* **20**(12): 1036-1039.
- Isaza, J. H., H. Ito and T. Yoshida 2001. A flavonol glycoside-lignan ester and accompanying acylated glucosides from *Monochaetum multiflorum*. *Phytochemistry* **58**(2): 321-327.
- Ishige, K., D. Schubert and Y. Sagara 2001. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine* **30**(4): 433-446.
- Jang, M., L. Cai, G. O. Udeani, K. V. Slowing, C. F. Thomas, C. W. W. Beecher, H. H. S. Fong, N. R. Farnsworth, A. D. Kinghorn and R. G. Mehta 1997. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* **275**(5297): 218-220.
- Joseph, S. V., I. Edirisinghe and B. M. Burton-Freeman 2015. Fruit polyphenols: a review of anti-inflammatory effects in humans. *Critical reviews in food science and nutrition* (just-accepted): 00-00.
- Juan, M. E. I., J. Buenafuente, I. Casals and J. M. Planas 2002. Plasmatic levels of trans-resveratrol in rats. *Food research international* **35**(2): 195-199.
- Juan, M. Emília, Irene Alfaras, and Joana M. Planas. Determination of dihydroresveratrol in rat plasma by HPLC. *Journal of agricultural and food chemistry* **58**.12 (2010): 7472-7475.
- Kang, Sun-Young, et al 2014. Biosynthesis of methylated resveratrol analogs through the construction of an artificial biosynthetic pathway in *E. coli*. *BMC biotechnology* **14**.1 2014: 67.
- Karabín, M. and T. Hudcová 2012. Význam chmelových prenylflavonoidů pro lidské zdraví. *Chem. Listy* **106**: 1095-1103.
- Kasper, H. and W. Burghardt 2015. *Výživa v medicíně a dietetika*. Praha, Grada.
- Kasper, H., U. Rabast and M. Ehl 1980. Studies on the extent of dietary fiber intake in West Germany. *Annals of Nutrition and Metabolism* **24**(2): 102-109.
- Kaufman, P. B., J. A. Duke, H. Brielmann, J. Boik and J. E. Hoyt 1997. A comparative survey of leguminous plants as sources of the isoflavones, genistein and daidzein: implications for

- human nutrition and health. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine* **3**(1): 7-12.
- Kim, D.-H., E.-A. Jung, I.-S. Sohng, J.-A. Han, T.-H. Kim and M. J. Han 1998. Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities. *Archives of pharmacal research* **21**(1): 17-23.
- Kim, M.-Y., P. Seguin, J.-K. Ahn, J.-J. Kim, S.-C. Chun, E.-H. Kim, S.-H. Seo, E.-Y. Kang, S.-L. Kim and Y.-J. Park 2008. Phenolic compound concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**(16): 7265-7270.
- King W. M. 2016 *Eicosanoids and Inflammatory responses* dostupné z: <https://themedicalbiochemistrypage.org/eicosanoids.php>
- Kivilompolo, Maarit 2009. Development of sample pretreatment and liquid chromatographic techniques for antioxidative compounds..
- Kopp, P. 1998. Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the 'French paradox'? *European Journal of Endocrinology* **138**(6): 619-620.
- Kopřiva, F. 2005. *Leukotrieny*. Praha, MAXDORF.
- Kuhnle, G., J. P. E. Spencer, G. Chowrimootoo, H. Schroeter, E. S. Debnam, S. K. S. Srail, C. Kutil, Zsofia, et al. 2014 Impact of wines and wine constituents on cyclooxygenase-1, cyclooxygenase-2, and 5-lipoxygenase catalytic activity. *Mediators of inflammation* 2014.
- Kutil, Zsofia, et al. 2015 Effect of Dietary Stilbenes on 5-Lipoxygenase and Cyclooxygenases Activities In Vitro. *International Journal of Food Properties* **18**.7: 1471-1477.
- Rice-Evans and U. Hahn 2000. Resveratrol is absorbed in the small intestine as resveratrol glucuronide. *Biochemical and biophysical research communications* **272**(1): 212-217.
- Landete, J. M. 2012. Plant and mammalian lignans: a review of source, intake, metabolism, intestinal bacteria and health. *Food Research International* **46**(1): 410-424.
- Langcake, P., C. A. Cornford and R. J. Pryce 1979. Identification of pterostilbene as a phytoalexin from *Vitis vinifera* leaves. *Phytochemistry* **18**(6): 1025-1027.
- Langcake, P. and R. J. Pryce 1976. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiological Plant Pathology* **9**(1): 77-86.
- Lattimer, J. M. and M. D. Haub 2010. Effects of dietary fiber and its components on metabolic health. *Nutrients* **2**(12): 1266-1289.
- Le Marchand, L. 2002. Cancer preventive effects of flavonoids—a review. *Biomedicine & pharmacotherapy* **56**(6): 296-301.
- Legette, L., L. Ma, R. L. Reed, C. L. Miranda, J. M. Christensen, R. Rodriguez-Proteau and J. F. Stevens 2012. Pharmacokinetics of xanthohumol and metabolites in rats after oral and intravenous administration. *Molecular nutrition & food research* **56**(3): 466-474.
- Lewis, S. J. and K. W. Heaton 1997. Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time. *Scandinavian journal of gastroenterology* **32**(9): 920-924.
- Liepke, C., K. Adermann, M. Raida, H. J. Mägert, W. G. Forssmann and H. D. Zucht 2002. Human milk provides peptides highly stimulating the growth of bifidobacteria. *European Journal of Biochemistry* **269**(2): 712-718.
- Liu, J. K., L. Hu, Z. J. Dong and Q. Hu 2004. DPPH Radical Scavenging Activity of Ten Natural p-Terphenyl Derivatives Obtained from Three Edible Mushrooms Indigenous to China. *Chemistry & biodiversity* **1**(4): 601-605.
- Louis, P., K. P. Scott, S. H. Duncan and H. J. Flint 2007. Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine. *Journal of applied microbiology* **102**(5): 1197-1208.
- Luckey, T. D. 1972. Introduction to intestinal microecology. *The American journal of clinical nutrition* **25**(12): 1292-1294.

- Lukaseder, B., S. Vajrodaya, T. Hehenberger, C. Seger, M. Nagl, G. Lutz-Kutschera, W. Robien, H. Greger and O. Hofer 2009. Prenylated flavanones and flavanonols as chemical markers in *Glycosmis* species (Rutaceae). *Phytochemistry* **70**(8): 1030-1037.
- Lüllmann, Heinz, Klaus Mohr, and Lutz Hein 2007. *Barevný atlas farmakologie*. Grada Publishing. ISBN: 978-80-247-1672-5
- MacRae, W. D., J. B. Hudson and G. H. N. Towers 1989. The antiviral action of lignans. *Planta medica* **55**(06): 531-535.
- Marteau, P., M. Minekus, R. Havenaar and J. H. J. Huis 1997. Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. *Journal of dairy science* **80**(6): 1031-1037.
- Mei, Yan-Zhen, et al. 2015 Biocatalysis and biotransformation of resveratrol in microorganisms. *Biotechnology letters* **37**.1: 9-18.
- Merken, Howard M., and Gary R. Beecher 2000. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**.3: 577-599.
- Miksicek, R. J. 1993. Commonly occurring plant flavonoids have estrogenic activity. *Molecular Pharmacology* **44**(1): 37-43.
- Ming, D. S., E. Guns, A. Eberding and G. H. Towers 2004. Isolation and characterization of compounds with anti-prostate cancer activity from *Arctium lappa* L. using bioactivity-guided fractionation. *Pharmaceutical biology* **42**(1): 44-48.
- Mitsuoka, T. and K. Hayakawa 1973. The fecal flora in man. I. Composition of the fecal flora of various age groups. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Erste Abteilung Originale. Reihe A: Medizinische Mikrobiologie und Parasitologie* **223**(2): 333.
- Mustafa, Arwa, and Charlotta Turner 2011. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Analytica chimica acta* **703**.1: 8-18.
- Namdeo, A. G. 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacognosy reviews* **1**(1): 69-79.
- The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1908. *Nobelprize.org*. Nobel Media AB 2014. Web. 11 Apr 2017. <http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1908/>
- Nováková, L. , Douša M. 2013 *Moderní HPLC separace v teorii a praxi. 1. vyd. Praha: Lucie Nováková, 299 s.* ISBN 978-80-260-4243-3.
- Opletal, L. 2016. *Přírodní látky a jejich biologická aktivita sv. 3.* Praha, Univerzita Karlova v Praze.
- Palacios, I., M. Lozano, C. Moro, M. D'arrigo, M. Rostagno, J. Martínez, A. García-Lafuente, E. Guillamón and A. Villares 2011. Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. *Food Chemistry* **128**(3): 674-678.
- Patek Jr, A. J. and J. Post 1941. Treatment of cirrhosis of the liver by a nutritious diet and supplements rich in vitamin B complex. *Journal of Clinical Investigation* **20**(5): 481.
- Perdigon, G., C. M. Galdeano, J. C. Valdez and M. Medici 2002. Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system. *European journal of clinical nutrition* **56**(n4s): S21.
- Peters, U., R. Sinha, N. Chatterjee, A. F. Subar, R. G. Ziegler, M. Kulldorff, R. Bresalier, J. L. Weissfeld, A. Flood and A. Schatzkin 2003. Dietary fibre and colorectal adenoma in a colorectal cancer early detection programme. *The Lancet* **361**(9368): 1491-1495.
- Pietta, P.-G. 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products* **63**(7): 1035-1042.
- Puttaraju, N. G., S. U. Venkateshaiah, S. M. Dharmesh, S. M. N. Urs and R. Somasundaram 2006. Antioxidant activity of indigenous edible mushrooms. *Journal of agricultural and food chemistry* **54**(26): 9764-9772.
- Pyrzynska, K., M. Biesaga 2009. Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **28**.7: 893-902.

- Rechner, Andreas R., et al. 2004 Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radical Biology and Medicine* 36.2 2004: 212-225.
- Reddy, B. S., A. Engle, B. Simi and M. Goldman 1992. Effect of dietary fiber on colonic bacterial enzymes and bile acids in relation to colon cancer. *Gastroenterology* **102**(5): 1475-1482.
- Renaud, S. d. and M. de Lorgeril 1992. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet* **339**(8808): 1523-1526.
- Del Rio, Daniele, et al. 2013 Dietary (poly) phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & redox signaling* 18.14 (2013): 1818-1892.
- Rolfes, S. R., K. Pinna and E. Whitney 2014. Understanding normal and clinical nutrition, Cengage Learning.
- Romieu, I., J. Sienra-Monge, M. Ramirez-Aguilar, H. Moreno-Macias, N. Reyes-Ruiz, B. E. del Rio-Navarro, M. Hernandez-Avila and S. London 2004. Genetic polymorphism of GSTM1 and antioxidant supplementation influence lung function in relation to ozone exposure in asthmatic children in Mexico City. *Thorax* **59**(1): 8-10.
- Rose, C., A. Parker, B. Jefferson and E. Cartmell 2015. The characterization of feces and urine: a review of the literature to inform advanced treatment technology. *Critical reviews in environmental science and technology* **45**(17): 1827-1879.
- Rosler, Jens, et al. 1997. Maize phenylalanine ammonia-lyase has tyrosine ammonia-lyase activity. *Plant physiology* 113.1 : 175-179.
- Ross, A. C. 2014. Modern Nutrition in Health and Disease, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Rotches-Ribalta, Maria, et al. 2012a Gut and microbial resveratrol metabolite profiling after moderate long-term consumption of red wine versus dealcoholized red wine in humans by an optimized ultra-high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry method. *Journal of Chromatography A* 1265 : 105-113.
- Rotches-Ribalta, Maria, et al. 2012b Pharmacokinetics of resveratrol metabolic profile in healthy humans after moderate consumption of red wine and grape extract tablets. *Pharmacological research* 66.5 (2012b): 375-382.
- Rozin, P., K. Kabnick, E. Pete, C. Fischler and C. Shields 2003. The Ecology of Eating Smaller Portion Sizes in France Than in the United States Help Explain the French Paradox. *Psychological science* **14**(5): 450-454.
- Rugg-Gunn, A. J., G. J. Roberts and W. G. Wright 1985. Effect of human milk on plaque pH in situ and enamel dissolution in vitro compared with bovine milk, lactose, and sucrose. *Caries Research* **19**(4): 327-334.
- Ruppin, H., S. Bar-Meir, K. H. Soergel, C. M. Wood and M. G. Schmitt Jr 1980. Absorption of short-chain fatty acids by the colon. *Gastroenterology* **78**(6): 1500-1507.
- Ryan, G. B. and G. Majno 1977. Acute inflammation. A review. *The american journal of pathology* **86**(1): 183.
- Rydning, A. and A. Berstad 1985. Dietary aspects of peptic ulcer disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **20**(sup110): 29-33.
- Saarinen, N. M., A. Warri, S. I. Makela, C. Eckerman, M. Reunanen, M. Ahotupa, S. M. Salmi, A. A. Franke, L. Kangas and R. Santti 2000. Hydroxymatairesinol, a novel enterolactone precursor with antitumor properties from coniferous tree (*Picea abies*). *Nutrition and cancer* **36**(2): 207-216.
- Savage, D. C. 1977. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annual Reviews in Microbiology* **31**(1): 107-133.

- Schatzkin, A., T. Mouw, Y. Park, A. F. Subar, V. Kipnis, A. Hollenbeck, M. F. Leitzmann and F. E. Thompson 2007. Dietary fiber and whole-grain consumption in relation to colorectal cancer in the NIH-AARP Diet and Health Study. *The American journal of clinical nutrition* **85**(5): 1353-1360.
- Scheppach, W., J. G. Müller, F. Boxberger, G. Dusel, F. Richter, H.-P. Bartram, S. U. Christl, C.-E. Dempfle and H. Kasper 1997. Histological changes in the colonic mucosa following irrigation with short-chain fatty acids. *European journal of gastroenterology & hepatology* **9**(2): 163-168.
- Schmitt, E., L. Lehmann, M. Metzler and H. Stopper 2002. Hormonal and genotoxic activity of resveratrol. *Toxicology letters* **136**(2): 133-142.
- Sender, R., S. Fuchs and R. Milo 2016. Are we really vastly outnumbered? Revisiting the ratio of bacterial to host cells in humans. *Cell* **164**(3): 337-340.
- Shacter, E. and S. A. Weitzman 2002. "Chronic inflammation and cancer." *Oncology* **16**(2): 217-232.
- Slezák, R., I. Dřízhal, J. Horáček and O. Kopecký 1997. *Infekční choroby ústní sliznice*, Grada Publishing.
- Soleas, G. J., E. P. Diamandis and D. M. Goldberg 1997. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clinical biochemistry* **30**(2): 91-113.
- Spencer, J. P., M. M. Abd El Mohsen, A.-M. Minihane and J. C. Mathers 2008. Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. *British Journal of Nutrition* **99**(01): 12-22.
- Společnost pro výživu 2011. *Referenční hodnoty pro příjem živin*. Praha: Výživaservis s.r.o.
- Stalikas, Constantine D. 2007 Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of separation science* **30**.18: 3268-3295.
- Stella, Laura, et al. 2008 Collisionally induced fragmentation of [M-H]⁻ species of resveratrol and piceatannol investigated by deuterium labelling and accurate mass measurements. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **22**.23 (2008): 3867-3872.
- Stevens, J. F., A. W. Taylor and M. L. Deinzer 1999. Quantitative analysis of xanthohumol and related prenylflavonoids in hops and beer by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **832**(1): 97-107.
- Sutter, V. L. 1984. Anaerobes as normal oral flora. *Review of Infectious Diseases* **6** (Supplement 1): S62-S66.
- Svačina, Š. et al. 2010. *Poruchy metabolismu a výživy*. 1. vyd. Praha: Galén, 505 s, ISBN 978-80-7262-676-2: 505.
- Sun, Xilan, Bin Peng, and Weidong Yan 2008. Measurement and correlation of solubility of trans-resveratrol in 11 solvents at T=(278.2, 288.2, 298.2, 308.2, and 318.2) K. *The Journal of Chemical Thermodynamics* **40**.4: 735-738.
- Szewczuk, L. M., L. Forti, L. A. Stivala and T. M. Penning 2004. Resveratrol is a Peroxidase-mediated Inactivator of COX-1 but Not COX-2 A MECHANISTIC APPROACH TO THE DESIGN OF COX-1 SELECTIVE AGENTS. *Journal of biological chemistry* **279**(21): 22727-22737.
- Trowell, H. 1976. Definition of dietary fiber and hypotheses that it is a protective factor in certain diseases. *The American journal of clinical nutrition* **29**(4): 417-427.
- Tsang, Siu Wai, et al. 2016 Inhibition of pancreatic oxidative damage by stilbene derivative dihydro-resveratrol: implication for treatment of acute pancreatitis. *Scientific reports* **6**: 22859.
- Van Rymenant, Evelien, et al. 2017 Chronic exposure to short-chain fatty acids modulates transport and metabolism of microbiome-derived phenolics in human intestinal cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **39** 2017: 156-168.
- Vaquero, M. J. R., M. R. Alberto and M. C. M. de Nadra 2007. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control* **18**(2): 93-101.

- Verzele, M., J. Stockx, F. Fontijn and M. Anteunis 1957. Xanthohumol, a new natural chalcone. *Bulletin des Sociétés Chimiques Belges* **66**(1): 452-475.
- Wadsworth, T. L. and D. R. Koop 1999. Effects of the wine polyphenolics quercetin and resveratrol on pro-inflammatory cytokine expression in RAW 264.7 macrophages. *Biochemical pharmacology* **57**(8): 941-949.
- Walle, T., F. Hsieh, M. H. DeLegge, J. E. Oatis and U. K. Walle 2004. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug metabolism and disposition* **32**(12): 1377-1382.
- Wang, B.-N., H. F. Liu, J. B. Zheng, M. T. Fan and W. Cao 2011. Distribution of phenolic acids in different tissues of jujube and their antioxidant activity. *Journal of agricultural and food chemistry* **59**(4): 1288-1292.
- Ward, R. S. 1982. The synthesis of lignans and neolignans. *Chemical Society Reviews* **11**(2): 75-125.
- Williams, C. L., M. Bollella and E. L. Wynder 1995. A new recommendation for dietary fiber in childhood. *Pediatrics* **96**(5): 985-988.
- Woods, M. N. and S. L. Gorbach 2001. Influences of fibre on the ecology of the intestinal flora. *CRC Handbook of dietary fibre in human nutrition*: 257-270.
- Yamamoto, A., S. Nitta, T. Miyase, A. Ueno and W. Li-Jun 1993. Phenylethanoid and lignan-iridoid complex glycosides from roots of *Buddleja davidii*. *Phytochemistry* **32**(2): 421-425.
- Yoder, S., S. Lancaster, M. A. J. Hullar, J. W. Lampe, D. Del Rio and K. Tuohy 2014. Gut microbial metabolism of plant lignans: influence on human health. *Diet-Microbe Interactions in the Gut: Effects on Human Health and Disease* **103**.
- Yu, C., Y. G. Shin, A. Chow, Y. Li, J. W. Kosmider, Y. S. Lee, W. H. Hirschelman, J. M. Pezzuto, R. G. Mehta and R. B. Van Breemen 2002. Human, rat, and mouse metabolism of resveratrol. *Pharmaceutical research* **19**(12): 1907-1914.
- Yun, B.-S., I.-K. Lee, I.-J. Ryoo and I.-D. Yoo 2001. Coumarins with Monoamine Oxidase Inhibitory Activity and Antioxidative Coumarino-lignans from *Hibiscus s yriacus*. *Journal of natural products* **64**(9): 1238-1240.
- Zelová, H., Z. Hanáková, Z. Čermáková, K. Šmejkal, S. Dalí Acqua, P. Babula, J. Cvačka and J. Hošek 2014. Evaluation of anti-inflammatory activity of prenylated substances isolated from *Morus alba* and *Morus nigra*. *Journal of natural products* **77**(6): 1297-1303.
- Zhang, G. L., N. Li, L. L. Lin and M. W. Wang 2007. Recent progresses in studies on bioactive lignans from plants. *China journal of Chinese materia medica* **32**(20): 2089-2094.
- Zurbier, K. W. M., S.-Y. Fung, J. J. C. Scheffer and R. Verpoorte 1998. In-vitro prenylation of aromatic intermediates in the biosynthesis of bitter acids in *Humulus lupulus*. *Phytochemistry* **49**(8): 2315-2322.
- Zykova, T. A., F. Zhu, X. Zhai, W. Y. Ma, S. P. Ermakova, K. W. Lee, A. M. Bode and Z. Dong 2008. Resveratrol directly targets COX-2 to inhibit carcinogenesis. *Molecular carcinogenesis* **47**(10): 797-805.
- Žiaková, Alica, Eva Brandšteterová, and Eva Blahova. Matrix solid-phase dispersion for the liquid chromatographic determination of phenolic acids in *Melissa officinalis*. *Journal of Chromatography A* **983.1** (2003): 271-275.
- Šmejkal, K. (2014). Cytotoxic potential of C-prenylated flavonoids. *Phytochemistry Reviews* **13**(1): 245-275.
- Šmejkal, K., S. Chudík, P. Klouček, R. Marek, J. Cvačka, M. Urbanová, O. e. Julínek, L. Kokoška, T. Šlapetová and P. Holubová 2008. Antibacterial C-geranylflavonoids from *Paulownia tomentosa* fruits. *Journal of natural products* **71**(4): 706-709.

9 Seznam zkratk

APCI – chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI – fotoionizace za atmosférického tlaku
B – Magnetický detektor
BAT – Batatasin
CI – Chemická ionizace
cAMP – cyklický adenosinmonofosfát
COX – enzym cyklooxygenáza
D – Dalton
DAD – Detektor diodového pole
DESI – Desorpční elektrosprej a ionizace
DMSO – Dimethylsulfoxid
EI – Elektronová ionizace
ESI – Elektrosprej
GALT – Imunitní systém sdružený s trávicím traktem
GIT – Gastrointestinální trakt
HIC – Hydrofóbní chromatografie
HILIC – Hydrofilní chromatografie
ICR – Iontová cyklotronová resonance
IL – Interleukin
IT – Iontová past
LC – kapalinová chromatografie
LIT – Lineární iontová past
LLE – Extrakce z kapaliny do kapaliny
M – Mol
MALDI – desorpce laserem za účasti matrice
MAE – Mikrovlnná extrakce
MS – hmotnostní spektrometr
Mh – Molární hmotnost
NP – Normální fáze
O – Orbitrap
OFN – Oxygen free nitrogen
OXY – Oxyresveratrol
PIC – Piceatannol
PIN – Pinostilben
PGL – Piceatannol-3-O-glukosid
PLE – Tlaková kapalinové extrakce
PST – Pinostilbenosid
Q – kvadrupól
QqQ – Trojitý kvadrupól
RES – Resveratrol
RP – Reverzní fáze
RT – Retenční čas
SCFA – Mastné kyseliny s krátkým řetězcem
SFE – Superkritická fluidní extrakce
SPE – Extrakce na pevné fázi
TGF- β – Transforming grow factor

THU – Thunaben
TLC – chromatografie na tenké vrstvě
TNF- α – Tumor necrosis factor
TOF – Time of flight
UV-VIS – Spektrální detektor
UAE – Ultrazvuková extrakce
UPLC – ultra kapalinová chromatografie