

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



Metabolismus stilbenoidů v tlustém střevě

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Tereza Scholzová

Obor studia: Výživa a potraviny

Vedoucí práce: doc. Ing. Jaroslav Havlík, Ph.D.

Konzultant: Ing. Veronika Jarošová, Mgr. Petr Maršík, Ph.D.

Čestné prohlášení

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

V Praze dne 13.4.2018 _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Jaroslavu Havlíkovi, Ph.D. za odborné vedení.
Ing. Veronice Jarošové a Mgr. Petru Maršíkovi, Ph.D. za cenné rady při psaní teoretické části
a Ing. Ondřeji Veselému za pomoc při práci v laboratoři.

Metabolismus stilbenoidů v tlustém střevě

Souhrn

Stilbenoidy se běžně vyskytují ve stravě konzumované lidmi po celém světě. Stilbenoidy lze nalézt v malých bobulích jako jsou hrozny a brusinky, v arašidech a dalších jedlých plodech. Je jim připisováno mnoho vlastností spojených s lidským zdravím. Po průchodu lidským trávicím traktem se tyto účinky mohou měnit s přeměnou těchto látek pomocí bakterií a vznikem metabolitů, proto mohou být účinky rovněž připisovány i jejich metabolitům.

Cílem práce byla fermentace šesti vybraných stilbenoidů (resveratrol, oxyresveratrol, pinostilben, piceatannol, thunalben a batatasin III) v *ex vivo* modelu lidského tlustého střeva po inokulaci stolicí dárce (n=5). Vzorky byly odebírány v průběhu 0, 2, 4, 8, 24 a 48 hodin. A poté byly analyzovány pomocí LC-QTOF po extrakci ethylacetátem. Analýza probíhala vždy ve třech opakováních.

Nejvíce metabolitů bylo identifikováno u piceatannolu a pinostilbenu. Z piceatannolu vznikaly tři metabolity (dihydropiceatannol, 3,5,3'-trihydroxy-*trans*-stilben a *trans*-resveratrol), které byly bakteriemi dále metabolizovány. Avšak u některých dárce vznikl z tohoto stilbenoidu pouze dihydropiceatannol. U pinostilbenu byl předpokládán vznik šesti metabolitů, vznikly však jen čtyři z nich, a to *trans*-resveratrol, 3,4'-dihydroxy-*trans*-stilben, dihydropinostilben a dihydroresveratrol. U thunalbenu došlo k odštěpení methoxy- skupiny, vznikl tak jen jeden metabolit batatasin III. Batatasin III byl velmi stabilní, a proto u žádného jedince nevznikal předpokládaný metabolit. U *trans*-resveratrolu bakterie pouze redukovaly dvojnou vazbu, čímž vznikl dihydroresveratrol. U oxyresveratrolu bakterie redukovaly dvojnou vazbu za vzniku dihydrooxyresveratrolu, poté po odštěpení hydroxylové skupiny daly vznik dihydroresveratrolu. Hlavní reakce, které probíhaly byly dehydroxylace jedné hydroxylové skupiny v poloze *-meta*, demethylace, oxidace dvojně vazby nebo její ztráta.

Mateřská molekula stilbenoidů v modelu tlustého střeva měla i po 48h nízký úbytek. Metabolity se tvořily, ale v malých koncentracích s velkými rozdíly mezi dárce. Stilbenoidy jsou tedy stabilní molekuly nepodléhající výraznému katabolismu, a jako takové jsou vystaveny absorpci skrz střevní epitel.

Klíčová slova: Fenolové sloučeniny, stilbenoidy, resveratrol, trávicí soustava člověka, mikrobiální metabolismus

Metabolism of stilbenoids in the large intestine

Summary

Stilbenoids are commonly found in a diet consumed by people all around the world. Stilbenoids can be found in small berries as grapes and cranberries, peanuts or another edible fruits. Many characteristics associated with human health are attributed to them. These effects can change with conversion of these compounds by bacteria and formation of metabolites after passage through the human digestive tract. These effects can be also ascribed to their metabolites.

The aim of work was the fermentation of six selected stilbenoids (resveratrol, oxyresveratrol, Pinostilben, piceatannol, thunalben and batatasin III) in ex vivo model of human colon after donor faeces inoculation (n=5). The samples were collected at 0, 2, 4, 8, 24 and 48 hours. And after that were analyzed by LC-QTOF after extraction with ethyl acetate. The analysis was performed in three repetitions.

Most metabolites were identified from piceatannol and pinostilben. Three metabolites (dihdropiceatannol, 3,5,3'-trihydroxy-trans-stilben and trans-resveratrol) were products from piceatannol and they were further metabolised by bacteria. However, in some donors only dihydrodropiceatannol was formed from this stilbenoid. We supposed the formation of 6 metabolites from pinostilben, but only 4 of them were created – trans-resveratrol, 3,4'-dihydroxy-trans-stilben, dihydropinostilben and dihydroresveratrol. The methoxy group in thunalben molecule was cleaved, so the batatasin III was formed. Batatasin III was very stable and therefore the anticipated metabolite was not detected. Bacteria in oxyresveratrol molecule reduced the double bond in the trans-resveratrol, so dihydroresveratrol was formed. Bacteria reduced the double bond to form the dihydroxyresveratrol and then the hydroxyl group was cleaved to form dihydroresveratrol. Main reactions were dehydroxylation of one hydroxyl group at the *-meta* position, demethylation, oxidation of the double bond or its loss.

Elemental stilbenoid molecule had a low loss after 48h in the colon model. Metabolites were formed in small concentrations with big differences between donors. Therefore stilbenoids are stable molecules, which are not subject to significant catabolism and they are subjected to absorption through the intestinal epithelia.

Keywords: phenolic compounds, stilbenoids, resveratrol, human digestive system, microbial metabolism

Obsah

1	Úvod	1
2	Cíl práce a hypotézy	2
2.1	Cíl práce	2
2.2	Hypotézy.....	2
3	Přehled literatury	3
3.1	Fenolické sloučeniny	3
3.1.1	Stilbenoidy a jejich metabolismy	4
3.1.2	Resveratrol	5
3.1.3	Oxyresveratrol.....	9
3.1.4	Piceatannol	10
3.1.5	Batatasin III.....	11
3.1.6	Pinostilben.....	11
3.1.7	Biologická aktivita vybraných stilbenoidů	12
3.1.7.1	Biologická aktivita resveratrolu	12
3.1.7.2	Biologická aktivita piceatannolu	14
3.1.8	Metabolismus stilbenoidů	15
3.2	Gastrointestinální ústrojí člověka.....	17
3.2.1	Anatomie a funkce gastrointestinálního traktu	17
3.2.2	Mikrobiota tlustého střeva	17
3.2.2.1	Funkce střevní mikrobioty.....	18
3.2.2.2	Složení mikrobioty tlustého střeva	18
3.2.2.3	Různorodost střevní mikrobioty v závislosti na věku	19
3.2.2.4	Různorodost střevní mikrobioty v závislosti na regionu	20
3.2.2.5	Prebiotika a probiotika	21
3.3	Polyfenoly a mikrobiota.....	22
3.3.1	Biotransformace polyfenolů ve střevě	22
3.3.2	Vliv polyfenolů na mikrobiom tlustého střeva	23
4	Materiál a metody	25
4.1	Materiál.....	25
4.1.1	Přístroje	26
4.2	Metody.....	26

4.2.1	Fermentace vzorků	26
4.2.2	Čistění vzorků	27
4.2.3	Měření vzorků	27
4.2.4	Statistické zpracování	28
5	Výsledky a diskuze	29
6	Závěr	40
7	Seznam použité literatury	41
8	Seznam zkratek	48

1 Úvod

V současné době je velkým problémem stoupající prevalence civilizačních onemocnění, nejčastěji rakoviny, obezity, diabetes mellitus a kardiovaskulárních onemocnění. V České republice umírá 44 % mužů a 54 % žen na kardiovaskulární onemocnění (ČR, 2014). Přes neustálé snižování zůstává úmrtnost na oběhová onemocnění dvakrát vyšší než v zemích bývalé EU 15.

Fenolické látky jsou produkty sekundárního metabolismu rostlin. Tyto látky se vyskytují v rostlinných tkáních, tedy i v potravinách rostlinného původu, a stilbenoidy patří k této skupině látek jsou předmětem pokračujícího výzkumu. V posledních letech se stále zlepšují znalosti o chemické struktuře a obsahu těchto látek v potravinách. Studie potvrzují pozitivní vliv na lidské zdraví, avšak aby stilbenoidy mohly být využity k léčbě, je třeba dalších výzkumů. Nejznámější a nejvíce prozkoumanou sloučeninou patří do skupiny stilbenů je *trans*-resveratrol. Ten se vyskytuje v drobných bobulích, jako jsou brusinky, borůvky, hroznové víno, ale i v semenech podzemnice olejné a různých druzích zeleniny. Resveratrolu je přisuzována role především u tzv. francouzského paradoxu. U obyvatel jižní Francie byl pozorován nižší výskyt kardiovaskulárních onemocnění, i přes skutečnost, že je tam konzumována strava s poměrně vysokým obsahem soli a nasycených tuků. Vědci tento jev přisuzují konzumaci červeného vína, které v této oblasti obsahuje vysoké koncentrace resveratrolu a dalších fenolických látek.

K větším poznatkům o resveratrolu došlo v 80. letech 20. století, kdy přístrojové vybavení (hlavně kapalinová chromatografie) umožnila sledování jeho výskytu a koncentraci v plodech vinné révy, *Vitis vinifera*. Poté byly zkoumány jeho biologické vlastnosti a v mnoha studiích bylo prokázáno, že je biologicky aktivní, vykazuje silnou antioxidační aktivitu a pohlcuje volné radikály. Pro tyto vlastnosti byl resveratrol využíván již dávno v tradiční čínské medicíně.

Stilbenoidy jsou látky, které není tělo schopné přirozeně syntetizovat. Člověk je tedy musí přijímat potravou. Bakterie vyskytující se v lidském těle, zejména v tlustém střevě, jsou schopné tyto látky metabolizovat na látky jiné. Tyto metabolity potom mohou mít podobné nebo lepší biologické účinky než původní látka. Tato práce se zabývá studiem katabolismu původních stilbenoidů a vznikem nových metabolitů.

2 Cíl práce a hypotézy

2.1 Cíl práce

Stilbenoidy patří mezi fenolové sloučeniny a u řady z nich, jako je například resveratrol, piceatannol nebo pterostilben, byla *in vitro* i *in vivo* prokázána významná biologická aktivita, například cytotoxicita a vliv na kardiovaskulární markery. Přesto, nový pohled na problematiku ukazuje, že polyfenoly jsou v lidském organismu z velké části metabolizovány účinkem střevní mikrobioty a jsou to právě metabolity, které jsou za aktivitu zodpovědné. Není velmi známo, zda a jak tento proces probíhá u stilbenoidů.

Cílem diplomové práce je fermentace vybraných stilbenoidů v *ex vivo* modelu lidskou stolicí a stanovení metabolitů prostřednictvím LC-MS analýzy. Vybrané látky a jejich metabolity budou dále testovány na transepiteliální transport v modelu Caco-2 buněk.

2.2 Hypotézy

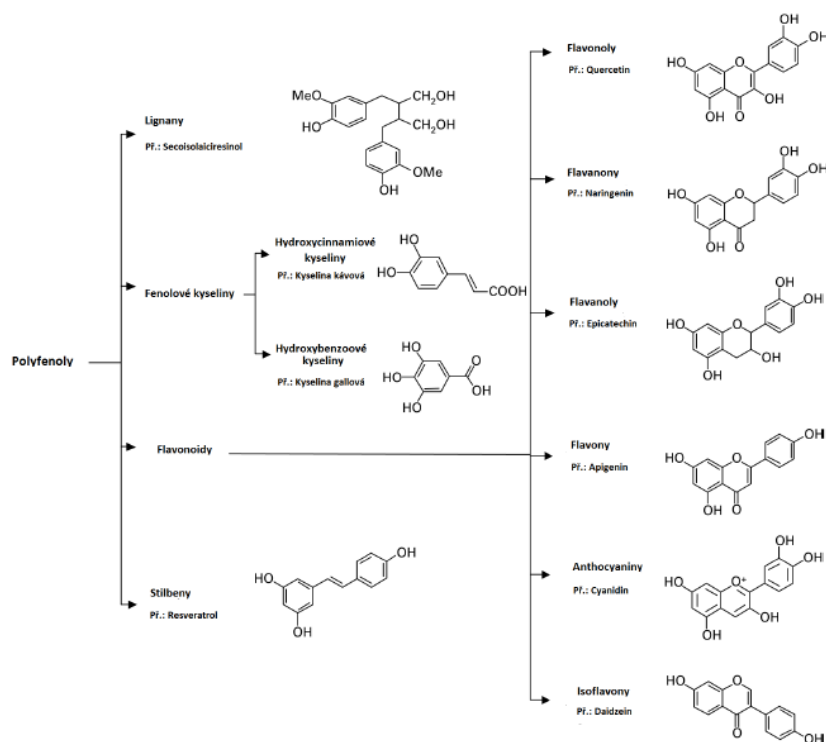
Předpokládáme, že některé z uvažovaných stilbenoidů jsou odolnější vůči mikrobiálnímu metabolismu v modelu tlustého střeva a zároveň jsou transepiteliálně transportovány ve formě mateřské molekuly nebo velmi podobných struktur, zodpovědných za bioaktivitu.

3 Přehled literatury

3.1 Fenolické sloučeniny

Fenolické látky jsou hojně se vyskytující mikronutrienty. Fenoly a polyfenoly představují jednu z nejpočetnějších a nejrozšířenějších skupin přírodních produktů rostlinné říše. Je známo více než 8000 fenolických struktur, mezi nimiž bylo zjištěno více než 4000 flavonoidů. Plní funkci antioxidantů, vitaminů a enzymů ochraňujících proti oxidačnímu stresu, který je způsobený přebytečnými reaktivními formami kyslíku (Tsao, 2010). V současnosti o tyto sloučeniny roste zájem, kvůli jejich souvislosti se sníženým výskytem rakoviny a kardiovaskulárních onemocnění. Zvýšený příjem červeného vína, které je bohaté na tyto látky, vysvětluje tzv. Francouzský paradox (Renaud and de Lorgeril, 1992), kdy obyvatelé jižní Francie mají nízkou mortalitu na kardiovaskulární onemocnění i přes vysoký obsah tuků v potravě (Slanina and Taborska, 2004). Příjem fenolů z potravin byl odhadnut na 1 gram denně, což je více než denní příjem vitamínu C, tokoferolu a karotenů. Nicméně v porovnání s vitaminy mají velmi malou biologickou dostupnost. Hlavními zdroji fenolických látek jsou hlavně nápoje (víno, čaj, káva, ovocné džusy), ovoce, zelenina a čokoláda (Slanina and Taborska, 2004). Na celkovém příjmu se ze dvou třetin podílí flavonoidy, jednou třetinou fenolové kyseliny a další fenolické látky tvoří minoritní podíl (např. stilbeny a lignany) (Zhang and Tsao, 2016).

V přírodě se fenolické sloučeniny vyskytují v různých formách. Ve své struktuře mají benzenové jádro s napojenou hydroxylovou skupinou (Zhang and Tsao, 2016). Aromatický charakter a vysoce konjugovaný systém s několika hydroxylovými skupinami činí tyto sloučeniny dobrými donory elektronů a atomů vodíku, neutralizují také volné radikály a další reaktivní druhy kyslíku (Zhang and Tsao, 2016). Podle počtu benzenových jader a sloučenin, které jsou na ně napojeny, jsou tyto sloučeniny klasifikovány do různých skupin (fenolové kyseliny, flavonoidy, stilbeny, kumariny, třísloviny). Klasifikace se různí podle zdroje. Velká část polyfenolů v rostlinách se vyskytuje ve formě glykosidu s různými jednotkami cukrů a acylovanými cukry připojenými v odlišných polohách na polyfenolové kostře (Tsao, 2010).



Obrázek 1: Rozdělení polyfenolických látek (Spencer et al., 2008)

3.1.1 Stilbenoidy a jejich metabolity

Stilbenoidy jsou dobře prostudovaná skupina přírodně se vyskytujících fytochemikálií. V přírodě jsou produkovány jako stresové metabolity v listech a v míze jako odpověď na houbovou infekci (Rimando and Suh, 2008). Tyto látky byly poprvé izolovány z rostlin již roku 1899, ale až v roce 1980 je Gorham pojmenoval. Podle své struktury jsou klasifikovány do 6 skupin – stilbeny, bibenzyls, bisbenzyls, fenantrenoidy, oligomery stilbenů a další stilbeny. Ze stilbenoidů jsou nejvíce prozkoumané stilbeny, zejména resveratrol a jeho analogy (Xiao et al., 2008).

Distribuce stilbenoidů v rostlinné říši je široká. V současné době počet stilbenoidů získaných z rostlin přesahuje číslo 1000 (Xiao et al., 2008). Například nejvíce prozkoumaný, resveratrol, se nachází v malých plodech jako jsou hrozny a brusinky, dále v arašidech a bylinách rodu *Polygonum*. Stilbenoidy strukturně příbuzné resveratrolu byly nalezeny v dalších jedlých plodech i léčivých rostlinách. Stejně jako resveratrol mají tyto fytochemikálie velké množství příznivých biologických účinků. Farmakologické vlastnosti těchto přírodních látek inspirovaly výrobu syntetických analogů. Tyto syntetické látky se stilbenovou kostrou se využívají například k prevenci a léčbě rakoviny (Rimando and Suh, 2008).

Základní struktura stilbenoidů je tvořena ze 2 aromatických kruhů spojených methylenovým můstkem. Vzhledem k tomu, že dvojná vazba neumožňuje volnou rotaci, jsou dvě možnosti konfigurace stilbenu – planární *trans*- nebo *cis*- konfigurace. V přírodě převažuje *trans*-(E) konfigurace, ale *cis*-(Z) konfiguraci stilbenů je také možno nalézt. Na tuto relativně jednoduchou strukturu jsou navázány hydroxylové skupiny, které jsou substituovány cukry a methylovými, methoxy a dalšími zbytky. Stilbeny mají také schopnost tvořit dimery, trimery a větší polymery (Xiao et al., 2008).

3.1.2 Resveratrol

Resveratrol je nejvíce popsaným stilbenem vyskytujícím se v přírodě. Poprvé byl izolován z kořenů kýchavice bílé (*Veratrum album*) roku 1940 a později v roce 1963 z kořenů křídlatky japonské (*Fallopia japonica*). Kořeny křídlatky jsou na resveratrol velmi bohaté, a proto jsou v současné době jeho hlavním zdrojem (Aggarwal et al., 2004). Tato rostlina však obsahuje nežádoucí antrachinony (emodin, fycion, chrysofanol, kvestin a další), které se musí při získávání resveratrolu extrahovat. Proto se pro nutriční účely extrahuje tento stilben z hroznů révy vinné. V rostlinách je resveratrol syntetizován jako sekundární metabolit v reakci na patogeny a abiotický stres (mechanické poškození, UV záření, ozon) (Shanmuganathan and Li, 2009). Řadí se mezi fytoalexiny a lze ho nalézt v 72 různých rostlinných druzích, zejména v borovicích, plodech chlebovníku, moruši, borůvkách, brusinkách, hroznovém vínu ale i v zelenině (Han et al., 2007, Kukreja et al., 2013). Z hlediska obsahu resveratrolu je ze zeleniny vhodné červené zelí, brokolice nebo červená řepa (tab. 1). V těchto druzích zeleniny je obsaženo 1,8 – 2,4 mg resveratrolu na 1 kg hmoty (Šmidrkal, 2004). Podle údajů od Šmidrkala et al. (2001) je významným zdrojem resveratrolu i podzemnice olejná. Chukwumah et al. (2012) uvádí, že obsah resveratrolu v arašidech se u různých kultivarů liší. U kultivaru Runner bylo nalezeno vyšší množství *trans*-resveratrolu (0,11 µg/g) než u kultivaru Valencia (0,08 µg/g) (Chukwumah et al., 2012). Podle phenol-explorer.eu je koncentrace resveratrolu v arašidech 0,08 mg/100 g. Koncentrace v podzemnici je tedy závislá na mnoha faktorech, na kultivaru, vegetačním období, klimatických podmínkách a zralosti arašídů.

Tabulka 1: Koncentrace resveratrolu v běžných druzích zeleniny

Rostlina	Resveratrol (mg/kg _{sušiny})	Resveratrol (mg/kg)	Množství (kg) obsahující 1 mg resveratrolu
Zelí čínské	9	0,5	2,2
Kapusta hlávková	7	1,0	1,0
Kapusta růžičková	15	2,6	0,4
Zelí červené	15	2,4	0,4
Zelí bílé	8	0,6	1,8
Brokolice	15	1,8	0,6
Čekanka	20	1,0	1,0
Petržel naťová	5	1,0	1,1
Mrkev karotka	4	0,4	2,5
Červená řepa	8	1,8	0,6
Česnek	2	0,6	1,7
Cibule žlutá	17	1,5	0,7
Cibule červená	12	1,1	0,9
Podzemnice olejná	2	1,9	0,5
Čajovník čínský	1	0,9	1,1

(Šmidrkal, 2004, Šmidrkal et al., 2001)

Tabulka 2: Koncentrace resveratrolu v dalších potravinách

Potravina	Množství mg/100 g
Hořká čokoláda	0,04
Jahody	0,35
Černý rybíz	1,57
Hrozny bílé	0,02
Hrozny tmavé	0,15
Brusinky	3,0
Borůvky	0,67
Arašídy	0,08
Arašídové máslo	0,04
Pistácie	0,11

Zdroj: www.phenol-explorer.eu

Resveratrol je považován za hlavní prospěšnou fytochemickou látku v červeném víně. Tvoří základní molekulu viniferinů, což jsou fytotalexinové polymery, které brání rozvoji houbových infekcí (King et al., 2006). Syntéza resveratrolu se pravidelně zvyšuje během procesu dozrávání hroznů, což vysvětluje rostoucí citlivost zralých plodů na infekci *Botrytis cinerea* (Jeandet et al., 2002). Koncentrace resveratrolu v rostlinách závisí na různých faktorech. Nejdůležitějšími z nich jsou počasí a přítomnost plísní a hub (Gambini et al., 2015). Podle Bavaresca et al. (2003) i infekce jinými houbami jako jsou například *Aspergillus japonicus*, *A. ochraceus* a *A. carbonarius* významně zvýšila syntézu *trans*-resveratrolu v porovnání s kontrolou u plodů *Vitis vinifera* L. cv. Barbera během dormance a dozrávání (Bavaresco et al., 2003). Nejbohatším zdrojem této látky jsou slupky, semena, řapíky a dřevo révy vinné (Elías Gómez, 2009). Při výrobě červeného vína jsou tyto části hroznů, kde je obsaženo nejvíce resveratrolu, macerovány. U bílého vína se takhle technika nepoužívá a z tohoto důvodu je červené víno bohatší na resveratrol než bílé víno. Tvorba alkoholu při fermentaci hroznů usnadňuje jeho rozpustnost a tím i jeho extrakci do nápoje (Gambini et al., 2015). Burns et al. (2002) uvádí, že hrozny obsahují zejména *trans*-resveratrol glukosid a to v koncentraci mezi 1,5 až 7,3 µg/g, zatímco *cis*-resveratrol nebyl přítomný v detekovatelném množství v žádném analyzovaném vzorku. Naopak ze čtyř vzorků červeného vína byl *trans*-resveratrol glukosid detekován pouze v jednom (tab. 2) (Burns et al., 2002).

Tabulka 3: Obsah *trans*-resveratrolu a *trans*-resveratrol glukosidu v červeném víně (*cis*-resveratrol byl kvantifikován jako ekvivalent *trans*-resveratrolu)

Vzorek červeného vína	<i>Trans</i> -resveratrol µg/100 ml	<i>Cis</i> -resveratrol µg/100 ml	<i>Trans</i> -resveratrol glukosid µg/100 ml
Pinot Noir, 1994 (Kalifornie)	1057 ± 60	746 ± 9	Nedetekován
Cabernet Sauvignon, 1996 (Bulharsko)	672 ± 10	520 ± 16	189 ± 5
Merlot, 1994 (Chile)	48 ± 1	45 ± 1	Nedetekován
Cabernet Sauvignon, 1995 (Kalifornie)	53 ± 1	45 ± 1	nedetekován

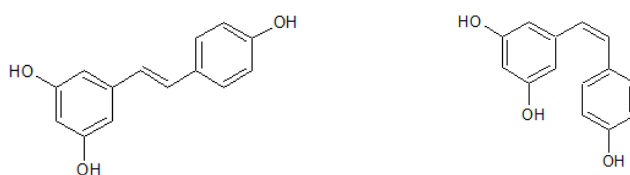
Zdroj: (Burns et al., 2002)

Experimentálně byly prokázány příznivé účinky resveratrolu na záněty, tumorogenezi, diabetes, stárnutí a neurologická onemocnění. Zřejmě díky těmto vlastnostem byl používán jako

složka japonské a čínské lidové medicíny pod názvem „kojo-kon“. Léčila se jím hnisavá dermatitida, kapavka, favus, tinea pedis a hyperlipidemie (Siemann and Creasy, 1992). V současné době je tento stilben prodáván jako výživový doplněk v různých formách, včetně čištěného resveratrolu z křídlatky japonské nebo ve směsi s dalšími biologicky aktivními látkami (Li et al., 2015).

Systematický název resveratrolu je 3,4',5-trihydroxystilben. Existuje ve dvou izomerech: *cis*-resveratrol a *trans*-resveratrol. *Trans*- forma je stabilnější a účinnější než *cis*- forma. Proto *trans*-resveratrol v přírodě převládá. *Cis*-izomerace může nastat, když je *trans*-resveratrol vystaven slunečnímu záření, umělému světlu nebo ultrafialovému záření při vlnové délce 254 nebo 366 nm (Chen et al., 2007). Burns et al. (2002) uvedl, že *cis*- forma zatím v hroznovém extraktu nebyla nalezena (Burns et al., 2002). Molekulární struktura je tvořena dvěma aromatickými jádry spojenými methylenovou dvojnou vazbou. Všechny tři hydroxylové skupiny resveratrolu jsou zodpovědné za silnou síť vodíkových vazeb (Drábiková et al., 2012). Jeho biologická aktivita závisí na přítomnosti intermolekulární vodíkové vazby, dvojně vazby a počtu i umístění hydroxylových skupin (Catalgol et al., 2012). Resveratrol se vyskytuje také ve formě glukosidů, β -glukosyloxy skupina je vázána v poloze 3- (triviální název piceid), nebo v poloze 4'- (resveratrolosid). I u těchto glukosidů jsou známy *trans*- i *cis*-izomery (Šmidrkal, 2004).

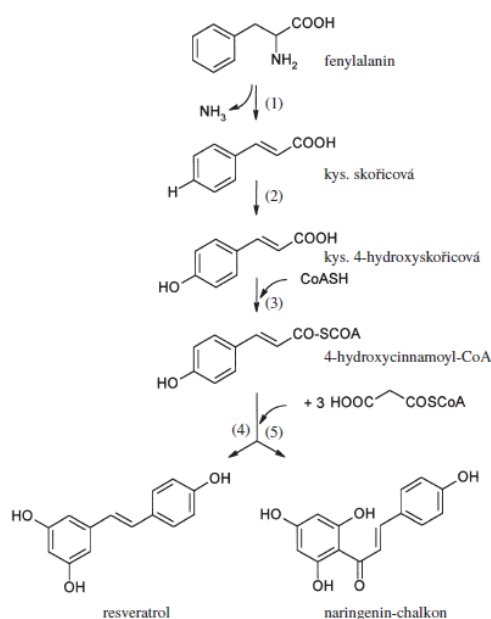
Resveratrol má lipofilní charakter, který vede k vysoké absorpci. Je však třeba poznamenat, že absorpce resveratrolu se může lišit v závislosti na způsobu konzumace a druhu potravy (Vitaglione et al., 2005).



Obrázek 2: Izomery resveratrolu (*trans*-resveratrol, *cis*-resveratrol)

Původními prekurzory pro biosyntézu resveratrolu jsou glykosidy, z nichž se vytvoří fenylalanin tzv. šikimátovou cestou (obr. 3). Fenylalanin je pomocí enzymu fenylalanin amonium-lyázy přeměněn na kyselinu skořicovou, která je poté oxidována na kyselinu 4-hydroxyskořicovou cinnamát-4-hydroxylázou. Tato kyselina reaguje s volným koenzymem A

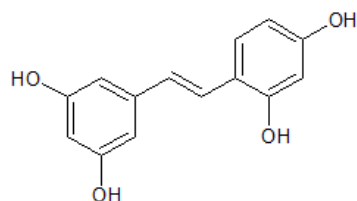
(CoA) za působení specifické CoA ligázy a vzniká 4-hydroxycinnamoyl-CoA. Z něho se kondenzací se třemi molekulami malonyl CoA pomocí enzymu resveratrol syntázy syntetizuje resveratrol. Při tomto procesu se uvolňují 4 molekuly oxidu uhličitého (Šmidrkal, 2004).



Obrázek 3: Biosyntéza resveratrolu (Šmidrkal et al., 2001)

3.1.3 Oxyresveratrol

Oxyresveratrol je polyfenol nacházející se v plodech moruše (*Morus alba*). Je to přírodně se vyskytující analog resveratrolu (Lorenz et al., 2003). Stejně jako resveratrol i oxyresveratrol vykazuje v preklinických studiích mnoho účinků podporujících zdraví – protizánětlivé, antioxidační, antivirové, hepatoprotektivní, neuroprotektivní a další. Také má bělící a fotoprotektivní účinky, což by mohlo být využito v kosmetice a dermatologii. Oxyresveratrol (*trans*-3,5,2',4'-tetrahydroxystilben) má navíc jednu hydroxylovou skupinu na aromatickém kruhu oproti resveratrolu, což vede k lepší rozpustnosti ve vodě (obr. 4). Chen et al. (2016) zjistili, že průměrná doba průchodu trávicím traktem oxyresveratrolu byla srovnatelná s dobou průchodu resveratrolu. Bylo zjištěno, že oxyresveratrol je perorálně biologicky dostupný. Byl absorbován mnohem rychleji a zůstal v těle delší dobu než resveratrol (Chen et al., 2016).

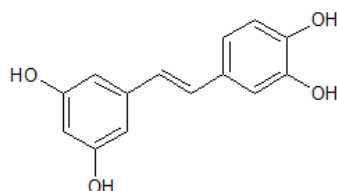


Obrázek 4: Oxyresveratrol

3.1.4 Piceatannol

Piceatannol (3,4',3',5-*trans*-trihydroxystilben) je analog resveratrolu, který má navíc jednu hydroxylovou skupinou v pozici 3' (obr.5). Je produkován metabolismem resveratrolu v lidském těle za přítomnosti enzymu CYP1B1 (cytochrom P450 1B1) jako hlavní metabolit (Catalgol et al., 2012). Stejně jako resveratrol se vyskytuje ve dvou izomerických formách, kdy *trans*- izomer je stabilnější než *cis*- isomer. Je to silný antioxidant a vykazuje protirakovinné a chemopreventivní účinky. Piceatannol i resveratrol jsou oba nerozpustné ve vodě, ale mohou být rozpuštěny v ethanolu a dimethyl sulfoxidu (DMSO) (Catalgol et al., 2012, Piotrowska et al., 2012).

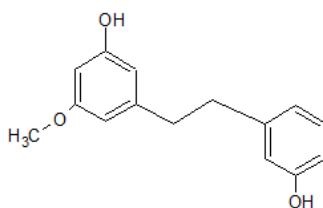
Piceatannol byl identifikován v mnoha rostlinách zejména v mučence jedlé (*Passiflora edulis*), rebarboře (*Rheum spp.*), *Cassia marginata*, *Melaleuca leucadendron*, *Euphorbia lagascae*, *Mezoneuron cucullatum*, *Vitis amurensis*, *Caragana tibetica*, *Rheum rhaponticum*, *Partneocissus tricuspidata* (Piotrowska et al., 2012). Lai et al. (2013) uvádí, že v rostlině *Rhodomyrtus tomentosa* známé jako „sim fruit“ je obsaženo 1000-2000krát větší množství piceatannolu než se nachází v červených hroznech (Lai et al., 2013). Avšak hlavním zdrojem piceatannolu v lidské výživě jsou hrozny a víno. Nicméně, v porovnání s resveratrolem je jeho koncentrace ve víně omezená. Cantos et al. (2003) zjistili, že v hroznovém víně je piceatannolu přibližně 4krát méně než resveratrolu (asi 0.78 a 3.18 µg/g), ale naopak v některých druzích červeného vína ho může být 2krát větší koncentrace než resveratrolu (Piotrowska et al., 2012). V italských vínech byla stanovena koncentrace *trans*-resveratrolu 0,63 až 3,39 mg/L, 0,48 až 4,93 mg/L *cis*-resveratrolu a 0,54 až 5,22 mg/L *trans*-piceatannolu. Obecně lze říci, že v červeném víně jsou obsaženy vyšší koncentrace těchto látek než ve víně bílém. Víno obsahující nejvíce těchto stilbenů se nazývá Montepulciano (Buiarelli et al., 2007).



Obrázek 5: Piceatannol

3.1.5 Batatasin III

Batatasin III (3,3'-dihydroxy-5-methoxybibenzyl) (obr. 6) je nejznámější bibenzyl izolovaný z mnoha rostlin rodu *Orchidaceae*. Tato látka vykazuje spasmolytické, alelopatické a inhibiční vlastnosti na klíčivost a růst radikul. Yang et al. (2014) uvádí, že polohový izomer batatasinu III, 3,4'-dihydroxy-5-methoxybibenzyl, má fytotoxické účinky. Tyto dva izomery jsou však jen zřídka získávány z rostlin současně (Yang et al., 2014)



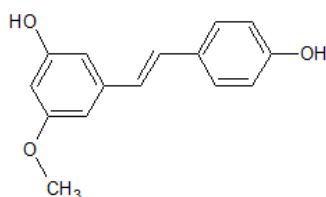
Obrázek 6: Batatasin III

3.1.6 Pinostilben

Pinostilben (3,4'-dihydroxy-5-methoxy-*trans*-stilben nebo 3-methoxyresveratrol) je methylderivát resveratrolu (obr. 7). Poprvé byl izolován z kůry borovice sibiřské (*Pinus sibirica*). Pinostilben má různé biologické účinky jako je neuroprotektce, chemoprevence, ale může působit i protizánětlivě a antimalariálně. Bylo prokázáno, že některé methylderiváty resveratrolu jsou stejně účinné nebo ještě účinnější ve svých chemoprotektivních a protinádorových vlastnostech než resveratrol (Chao et al., 2010). Například trimethylderivát resveratrolu a pinostilben jsou až stokrát více cytotoxické v rakovinných buněčných liniích než resveratrol, což je zprostředkováno vyčerpáním intracelulárního množství polyaminů a změnou polymerace mikrotubulů (Jeong et al., 2014). Také se uvádí, že vykazuje silnější neuroprotektivní efekt proti neurotoxicitě indukované 6-hydroxydopaminem než resveratrol v SH-SY5Y buňkách (Chao et al., 2010). Protože je pinostilben hydrofobnější než resveratrol, penetruje buněčnou membránu mnohem rychleji, což vede k vyšší efektivní intracelulární

dávce a zvýšené biologické dostupnosti. Je usuzováno, že methylací hydroxylové skupiny resveratrolu se zvyšuje jeho hydrofobicita a zlepšuje se vstřebávání těchto derivátů buňkou (Jeong et al., 2014).

Naopak Chen et al. (2016) uvádí, že špatná rozpustnost pinostilbenu ve vodě pravděpodobně přispívá k jeho nízké perorální biologické dostupnosti. Dále uvádí, že rozpustnost ve vodě není hlavní překážkou biologické dostupnosti, jelikož pterostilben, který je více lipofilní, vykazuje mnohem lepší orální absorpci než pinostilben. Po intravenózním podání pinostilbenu, byla pozorována jeho rychlá eliminace, což naznačuje jeho metabolickou nestabilitu. Studie Chen et al. (2016) naznačuje, že stilbeny s hydroxylovými skupinami v poloze *-meta* (resveratrol, pinostilben a pinosylvin) mohou být metabolicky nestabilní, rychle se eliminují a mají nízkou perorální biologickou dostupnost. Na druhou stranu stilbeny s hydroxylovou skupinou v poloze *-para*, např. pterostilben a *trans*-4,4'-dihydroxystilbeny, jsou méně citlivé na II. fázi metabolismu a proto mají relativně lepší orální biologickou dostupnost (Chen et al., 2016, Yeo et al., 2013).



Obrázek 7: Pinostilben

3.1.7 Biologická aktivita vybraných stilbenoidů

3.1.7.1 Biologická aktivita resveratrolu

Resveratrol zajišťuje mnoho biologických funkcí a má různé mechanismy působení. Může inhibovat rozvoj různých onemocnění, jako jsou kardiovaskulární a neurodegenerativní onemocnění, karcinogeneze, nebo zpomalení procesu stárnutí (Kukreja et al., 2014). Také byly zjištěny jeho protizánětlivé, antioxidační a antimikrobiální vlastnosti. Resveratrol má mnoho prospěšných účinků na lidské zdraví, avšak jeho nízká biologická dostupnost a rychlý metabolismus omezuje jeho použití pouze na vyloučení chronických onemocnění (Paulo et al., 2001).

Resveratrol zároveň působí jako antioxidant a podílí se na vyloučení volných radikálů. Zvyšuje aktivitu antioxidačních enzymů jako je glutathion peroxidáza, SOD (superoxiddismutáza), kataláza a glutathion reduktáza (de la Lastra and Villegas, 2007). Také

udržuje hladinu intracelulárních antioxidantů v biologických systémech (Bonda et al., 2011). Bylo prokázáno, že resveratrol inhibuje oxidačně indukovanou apoptózu v různých buněčných liniích, jako jsou fibroblasty 3T3 myši, potkaní feochromocyty, mononukleární buňky periferní krve a retinální pigmentový epitel člověka (King et al., 2005). Antioxidační aktivita resveratrolu může být také spojena s ochranou proti rozvoji aterosklerózy. Oxidace lipoproteinů s nízkou hustotou (LDL) přispívá k rozvoji této choroby. Bylo prokázáno, že resveratrol inhibuje oxidaci LDL katalyzovanou síranem měďnatým a v menší míře oxidaci LDL iniciovanou 2,2'-azobisdihydrochloridem (Belguendouz et al., 1997).

Aluyen et al. (2012) uvádí, že resveratrol inhibuje propuknutí a rozvoj rakoviny. Podporuje protirakovinnou aktivitu inhibicí angiogeneze. Bylo zjištěno, že inhibuje proliferaci nádoru prsu, tračníku a prostaty (Aluyen et al., 2012). Signorelli et Ghidoni (2005) uvádí, že protirakovinný efekt resveratrolu je spojen s poškozením mitochondriální funkce, což vede k nárůstu reaktivních druhů kyslíku a k apoptóze. Také potlačuje cytochrom P450, jež je považován za prokarcinogen (Signorelli and Ghidoni, 2005). Rovněž bylo prokázáno, že resveratrol má estrogenní aktivitu díky své strukturní podobnosti s estrogením činidlem diethylstilbestrolem. Použitím estrogen-pozitivních buněk MCF-7 karcinomu prsu bylo zjištěno, že *trans*-resveratrol kompetitivně inhibuje vazbu [³H]estradiolu na receptory estrogenu typu 1 a také receptory aktivuje. Tato schopnost antagonizovat vazbu na estrogen poskytuje důvod pro případné použití *trans*-resveratrolu při prevenci nebo léčbě rakoviny prsu (Williams et al., 1996).

Paulo et al. (2001) uvádí, že resveratrol má také antimikrobiální vlastnosti. Inhibuje růst patogenních mikroorganismů - grampozitivních, gramnegativních bakterií a hub jako jsou *Aspergillus niger*, *Helicobacter pylori*, *Aspergillus flavus*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa* (Paulo et al., 2001). U bakterie *Escherichia coli* zabraňuje růstu pomocí oxidačního poškození buněčné membrány. Jako potenciální antimikrobiální prostředek by mohl být v budoucnu využíván k léčbě infekcí způsobených různými patogeny (Kukreja et al., 2014).

Resveratrol jako kardioprotektivní prostředek inhibuje nahromadění krevních destiček, potlačuje peroxidázové reakce cyklooxygenázy 2 (COX-2) a vytvoření tromboxanu A₂, což má za následek vazodilataci. Vazodilatační účinek je vyvolán stimulací syntézy oxidu dusnatého v endotelu cév. Wallerath et al. (2002) uvádí, že tato stimulace je závislá na dávce a při koncentraci resveratrolu 10 μmol/l bylo zaznamenáno zvýšení produkce oxidu dusnatého o 50 %. Bylo pozorováno, že menší dávky resveratrolu, které člověk přijme běžnou stravou,

mají kardioprotektivní účinek (Kukreja et al., 2014, Wallerath et al., 2002). Dále může být prospěšný při léčbě neurologických onemocnění jako je Parkinsonova nebo Huntingtonova nemoc, při léčbě beta talasémie a také v prevenci a léčbě diabetes mellitus (Kukreja et al., 2014).

3.1.7.2 Biologická aktivita piceatannolu

Stejně jako resveratrol, piceatannol má mnoho biologických účinků. Jsou mu připisovány protirakovinné, protizánětlivé, antioxidační a antileukemické účinky (Kukreja et al., 2014). Piceatannol vykazuje protirakovinné účinky díky jeho potenciálu inhibovat šíření obrovského množství různých nádorových buněk, jako jsou lymfomy, leukémie, nádory prsu, prostaty a tlustého střeva. Byla pozorována zvýšená inhibice a proapoptický účinek na nádorové buňky. Tento účinek může být způsoben ztrátou mitochondriálního potenciálu, aktivací kaspáz a uvolněním cytochromu C. Proapoptická aktivita piceatannolu byla pozorována u různých rakovinných buněk včetně těch v kůži, prostatě, močovém měchýři a prsou (Piotrowska et al., 2012). Wolter et al. (2002) uvádí, že u nádorů tlustého střeva a jater, byl piceatannol zodpovědný za nahromadění buněk v G1 a S fázi buněčného cyklu. Naopak u rakoviny močového měchýře piceatannol indukoval apoptózu a zabránil vývoji buněk ve fázi G0/G1 (Wolter et al., 2002).

Díky své antidiabetické fytochemické aktivitě, může tento stilben hrát roli i v prevenci diabetes mellitus typu 2. Zlepšuje vstřebávání glukózy, AMPK fosforylaci a translokaci transportéru glukózy 4 (GLUT4), což může překonat insulinovou rezistenci (Piotrowska et al., 2012).

Tang et Chan (2014) uvádí, že piceatannol je také efektivní v prevenci kardiovaskulárních onemocnění jako je arytmie, hypercholesterolemie, angiogeneze a ateroskleróza. Předběžná léčba piceatannolem potlačovala srdeční hypertrofii, která byla stanovena vyjádřením hladiny markerů hypertrofie, průřezové plochy a poměru hmotnosti srdce (Kukreja et al., 2014).

V porovnání s resveratrolem má piceatannol silnější protirakovinné účinky a také má větší schopnost vychytávat volné radikály. Díky přítomnosti další hydroxylové skupiny je piceatannol reaktivnější a je účinnějším antioxidantem. Koncentrace piceatannolu potřebná k vychytávání volných radikálů je 1200krát nižší, než je tomu u resveratrolu (polovina maximální inhibiční koncentrace IC₅₀ byla 3.39·10 μM pro resveratrol a 2.69·10⁻³ μM pro piceatannol) (Piotrowska et al., 2012).

3.1.8 Metabolismus stilbenoidů

Hromadí se názory, že příznivé účinky připisované resveratrolu jsou způsobeny spíše jeho metabolity než samotným resveratrole (Smoliga and Blanchard, 2014). Resveratrol je schopný tvořit různé organické molekulární komplexy. Sterifikace hydroxylových skupin s alifatickými molekulami může být také použita jako nástroj ke zvýšení intestinální absorpce a buněčné permeability. Například acetylace resveratrolu může zvýšit jeho absorpci a průchod epitheliální buňkou bez ztráty aktivity (Colin et al., 2009, Marel et al., 2008).

Ve střevech se resveratrol absorbuje pasivní difúzí nebo tvoří komplexy s membránovými transportéry, jako jsou integriny. V krevním řečišti se resveratrol nachází v podstatě ve třech různých formách: glukuronid, sulfát nebo volný resveratrol. Volná forma může být navázána na albumin a lipoproteiny, jako je LDL. Tyto komplexy mohou být navíc disociovány na buněčných membránách, které mají receptory pro albumin a LDL, takže volný resveratrol neumožňuje vstup do buněk (Delmas et al., 2011). Díky svým chemickým vlastnostem může resveratrol reagovat s mastnými kyselinami. Nedávné studie *in vitro* ukazují, že více než 90 % volného *trans*-resveratrolu se váže na lidské plazmatické lipoproteiny. Tato vazba se také objevuje *in vivo*, jak dokládá přítomnost dietních polyfenolických sloučenin zjištěných v izolovaném LDL ve vzorcích krve zdravých dobrovolníků (Urpí-Sardà et al., 2005, Urpi-Sarda et al., 2007). Mastné kyseliny vytváří lipofilní prostředí, které podporuje transport resveratrolu (Jannin et al., 2004).

Resveratrol má stejně jako ostatní stilbenoidy omezenou perorální biologickou dostupnost, což je způsobeno především rozsáhlým metabolismem fáze II (glukuronidací a sulfatací). Metabolismus resveratrolu nebo jeho fáze II-metabolitů probíhá v játrech. Prostřednictvím enterohepatálního transportu žlučí mohou být tyto látky navráceny zpátky do tenkého střeva (Burns et al., 2002). I přes nízkou biologickou dostupnost vykazuje resveratrol účinnost *in vivo*. To lze vysvětlit přeměnou sulfátů a glukuronidů opět na resveratrol v cílových orgánech, jako jsou játra (Wenzel and Somoza, 2005). Dalším možným vysvětlením by mohla být enterohepatální recirkulace metabolitů resveratrolu, následovaná jeho dekonjugací v tenkém střevě a jeho reabsorpcí. Konečné *in vivo* účinky mohou být vysvětleny aktivitou jeho metabolitů (Marier et al., 2002). Wenzel a Somoza (2005) uvádí, že glukuronidace *cis*-formy je rychlejší (5-10 krát) než *trans*-formy, což vede k nižší biologické dostupnosti *cis*-formy (Wenzel and Somoza, 2005). Cottard et al. (2010) a další zjistili pět různých metabolitů v moči: resveratrol monosulfát, dvě izomerické formy resveratrol monoglukuronidu, monosulfát dihydroresveratrol a monoglukuronid dihydroresveratrol. Chen

et al. (2007) uvádí, že ve vzorcích lidské moči byly identifikovány *cis*-metabolity, zejména *cis*-resveratrol-4'-sulfát, *cis*-resveratrol-3-O-glukuronid a *cis*-resveratrol-4'-O- glukuronid. Výzkum byl proveden s *trans*-izomerem kvůli nestabilitě *cis*-isomeru (Chen et al., 2007). Data však naznačují, že oba mohou mít různé biologické účinky (Campos-Toimil et al., 2007, Orallo, 2006). Povaha a množství těchto metabolitů se může mezi jednotlivými subjekty lišit z důvodu vzájemné variability (Cottart et al., 2010, Gambini et al., 2015, Walle et al., 2004). Jiné flavonoidy ve stravě například kvercetin, mohou inhibovat sulfataci a glukuronidaci resveratrolu v játrech a duodenální tkáni, což zvyšuje jeho biologickou dostupnost (Wenzel and Somoza, 2005)

Resveratrol i oxyresveratrol byly shodně po absorpci podrobeni konjugaci a poté bylo identifikováno několik glukuronidů a sulfátů jako metabolitů fáze II. Tyto konjugační reakce byly pozorovány také u oxyresveratrolu a pterostilbenu (Chen et al., 2016). Bylo prokázáno, že sulfátové metabolity resveratrolu vedou k biologicky relevantním koncentracím intracelulárního resveratrolu. Je možné, že monosulfáty resveratrolu se dostanou do cílových tkání účinněji, protože jsou stabilnější v konjugované formě. Poté regenerují resveratrol a udržují v plazmě i v tkáních fyziologické koncentrace. Také byla provedena *in vitro* studie na buněčné linii kolorektálního karcinomu HT-29 která ukázala, že sulfátové metabolity slouží jako intracelulární zásobárna resveratrolu (Patel et al., 2013).

Studie Chena et al. (2016) na potkanech, byla provedena s cílem charakterizovat farmakokinetický profil oxyresveratrolu, analogu resveratrolu. Bylo zjištěno, že perorální biologická dostupnost resveratrolu vykazuje lineární farmakokinetiku, a to i při vysokých dávkách (200 a 400 $\mu\text{mol/kg}$). Das et al. (2008) provedli studii se zvyšováním dávky, kde bylo potkanům Sprague Dawley podáno 15, 25 a 50 mg/kg resveratrolu. Žádná z dávek neukázala významný rozdíl v biologické dostupnosti, přičemž resveratrol vykazoval lineární farmakokinetiku dokonce i při dávkách až 50 mg/kg (Das et al., 2008).

Bylo předpokládáno, že oxyresveratrol bude více náchylný k II fázi metabolismu a bude mít horší farmakokinetický profil než resveratrol z důvodu jedné hydroxylové skupiny navíc. Naopak studie na potkanech Chena et al. (2015) prokázala, že jeho plazmatická hladina po perorálním příjmu je srovnatelná s resveratrole. Metabolickou stabilitu tedy pravděpodobně neurčuje počet hydroxylových skupin, ale jejich umístění. To je zdůvodněno i pozorováním pinosylvinu (*trans*-3,5-dihydroxystilben) a *trans*-4,4'-dihydroxystilbenu v organismu. Oba mají ve své struktuře dvě hydroxylové skupiny, avšak jejich farmakologické profily se zjevně lišily. Z testovaných hydroxystilbenů, resveratrol vykazoval nejvýraznější „dvojitý vrchol“, což

je způsobeno enterohepatálním oběhem, který výrazně přispívá k expozici resveratrolu v systémovém oběhu (Chen et al., 2015, Chen et al., 2016).

3.2 Gastrointestinální ústrojí člověka

Trávicí trakt je systém orgánů u všech mnohobuněčných živočichů, kterým umožňuje štěpit a získávat energii z potravy a vyloučit nestravitelné zbytky. Nejdůležitější funkcí trávicího traktu je zažívání usnadněné motilitou, sekrecí a absorpcí. Každá funkce tohoto ústrojí je podmíněna stavbou a chováním jednotlivých buněčných typů a tkání (Liao et al., 2009).

3.2.1 Anatomie a funkce gastrointestinálního traktu

Trávicí trakt prochází tělem jako souvislá trubice, na niž jsou napojeny vývody žlučovodu a pankreatu. Hlavní funkcí gastrointestinálního traktu je transport a trávení stravy. Nicméně, trávení není jedinou důležitou funkcí. Například střevo má význam i pro imunitu (Gregersen and Kassab, 1996). Gastrointestinální trakt je složen ze série orgánů, které jsou svou morfologií a jinými mechanickými vlastnosti svaloviny velmi různorodé. Mezi jednotlivými orgány se nacházejí svěrače, které rozdělují trubici na menší kompartmenty, ale také umožňují dávkování tráveniny do dalších částí trávicí trubice (Liao et al., 2009).

Stěna trávicí trubice je složena ze 4 vrstev, a to jsou mukóza, submukóza, svalovina a seróza. Svalová vrstva sestává z vnější podélné a vnitřní kruhové svaloviny. Na kolagen bohatá submukóza a mukóza se nachází uvnitř svalové vrstvy. Pohyby jsou uskutečněny pomocí antegrádního průtoku pro zajištění promíchání obsahu a kontaktu s absorpční plochou. Kontrakce se v každé části traktu značně liší. Pohyby stěn během digesce a absorpce jsou výsledkem kontrakcí dvou vrstev hladkého svalstva. Stažení podélné svaloviny zkrátí střevní stěny, zatímco peristaltické stahy kruhové svaloviny obsah pomalu posouvají a promíchávají (Liao et al., 2009, Takaki, 2003).

3.2.2 Mikrobiota tlustého střeva

Lidská střevní mikrobiota je složena z několika trilionů mikroorganismů a odhadem až desetinásobně převyšuje počet tělních buněk (Bäckhed et al., 2005). Celkové množství mikrobiálních buněk ve střevním traktu je okolo 10^{13} až 10^{14} . To znamená, že organismus člověka je pouze z 10 % procent tvořen buňkami těla a zbylých 90 % tvoří bakteriální buňky (Zhao, 2013). Navíc, celý genom střevních mikroorganismů obsahuje přibližně 150krát více genů než ten lidský (Qin et al., 2010). Studie Cabreiro et al. (2013) definovala mnoho funkcí

střevního mikrobiomu, mezi něž patří fermentace nestravitelných polysacharidů, syntéza esenciálních aminokyselin a vitaminů a metabolismus xenobiotických léčiv (Cabreiro et al., 2013).

3.2.2.1 Funkce střevní mikrobioty

Mikroorganismy v tlustém střevě mají mnoho důležitých funkcí na lidské zdraví a ovlivňují hostitele pomocí různých interakcí. Některé střevní mikroorganismy umožňují například fermentaci komplexu nestravitelných sacharidů a produkují mastné kyseliny s krátkým řetězcem jako je acetát, propionát a butyrát. Rozsáhlé profilování lidského intestinálního mikrobiomu ukázalo, že s dysbiózou střevní mikroflóry je spojeno několik běžných onemocnění. Dysbióza je vysvětlena jako narušená rovnováha mezi prospěšnými bakteriemi s protizánětlivými vlastnostmi a pathobionty s prozánětlivým účinkem. Navíc je mnoho nemocí spojeno se sníženou diverzitou mikroorganismů tlustého střeva. U některých onemocnění však není jasné, zda je dysbióza příčinou či následkem léčby (von Martels et al., 2017). Shin et al. (2015) uvádí, že narušením střevní mikrobioty antibiotiky nebo infekčními patogeny, může dojít k výraznému rozšíření rodu *Enterbacteriaceae*, který je považován za známku dysbiózy (Shin et al., 2015).

3.2.2.2 Složení mikrobioty tlustého střeva

Střevní mikrobiota je velká a různorodá skupina obsahující různé formy života. Nejvíce zastoupené jsou bakterie, které jsou také nejprostudovanější ze střevních mikroorganismů, dále archaea, eukaryota, viry a paraziti (Lozupone et al., 2012). Bylo odhadnuto, že střevní trakt osidluje přes 1000 bakteriálních druhů, ale většina bakterií se řadí jen ke dvěma, a to jsou *Bacteroidetes* a *Firmicutes* (Bäckhed et al., 2005). Díky zlepšování moderních technik sekvenování genomu je stále detekováno mnoho nových mikrobů. Bakterie, které se zde nachází, mají anaerobní metabolismus. Většina z nich je striktně anaerobní, což znamená, že jsou citlivé na kyslík. Další velmi početnou skupinou jsou viry. Bylo identifikováno více než 1200 virových genotypů o hustotě 10^9 virionů na gram sušiny v lidské stolici (Li et al., 2016).

Ekologie mikrobioty střeva je dynamická a to znamená, že ne všechny bakterie mohou kolonizovat střevo permanentně. Koevoluce mezi komenzálními mikroby a jejich hostiteli vedla při vývoji řady mechanismů ve prospěch jejich kolonizace. Například *Lactobacillus rhamnosus* GG efektivně přilne k lidské střevní mukóze zakódováním pili proteinu vázaného na mukózu (Kankainen et al., 2009) a *Bacteroides fragilis* produkuje povrchové kapsulární polysacharidy, aby mohl kolonizovat střevo (Liu et al., 2008). Tyto původní komenzální

bakterie hrají rozhodující roli v obraně proti příležitostným exogenním patogenům prostřednictvím konkurenčního vyloučení. Tento jev je viditelný u *Bifidobacterium longum* subsp. *Longum* JMC 1217T, které chrání střevo proti *Escherichia coli* O157:H7, což je bakterie způsobující enterohepatogenní infekci (Fukuda et al., 2011)

Bylo zjištěno, že existují významné rozdíly ve složení střevní mikrobioty u různých populací. Podle struktury a funkcí jednotlivých bakteriálních rodů lze lidskou střevní mikrobiotu rozdělit do enterotypů 1, 2 a 3, které jsou nezávislé na pohlaví, věku, národnosti, stravovacích zvyklostech ani na indexu tělesné hmotnosti hostitele (Arumugam et al., 2011). Enterotyp 1 je charakterizován vysokým zastoupením rodu *Bacteroides* a velkým sacharolytickým potenciálem. U enterotypu 2 převažují bakterie rodu *Prevotella*. Tento enterotyp má vysoký potenciál pro degradaci glykoproteinu mucinu. Hlavním zástupcem třetího enterotypu jsou bakterie rodu *Ruminococcus* a mezi jeho vlastnosti patří schopnost degradace mucinu a membránového transportu (Jandhyala et al., 2015). Podle Arumugama et al. (2011) se nejčastěji vyskytuje enterotyp 3 – *Ruminococcus*. K obohacení druhů v jednotlivých enterotypech mohou přispět různé fermentační substráty v tračníku. Ale je velmi pravděpodobné, že střevní mikrobiota je u každého jedince stabilní a může být dokonce obnovena po nějakém narušení (Li et al., 2016).

3.2.2.3 Různorodost střevní mikrobioty v závislosti na věku

Složení střevní mikrobioty se neliší jen u jednotlivých populací, ale různí se také v závislosti na věku. Vznik a kolonizace střeva je komplexní proces ve kterém je zapojena řada interakcí mezi mikroby a hostitelem a mezi mikroby samotnými. Zdravá střevní mikrobiota se zakládá již v útlém dětství a hraje velmi důležitou roli pro udržení zdraví během celého života (Li et al., 2016).

Má se za to, že v prostředí dělohy se nenarozené děti nachází ve sterilním prostředí. Avšak, DiGiulio et al. (2008) předpokládá, že v amniotické tekutině, placentě, pupeční šňůře a mekoniu jsou přítomny některé komenzální bakterie, které se přenáší z matky na dítě. Důležitým faktorem ovlivňující kolonizaci střeva je způsob porodu. Bakteriální společenství dětí narozených přirozeným porodem se podobá matčině vaginální mikrobiotě, zatímco děti narozené císařským řezem mají bakterie podobné spíše bakteriím matčiny kůže. Jakobsson et al. (2014) uvádí, že střevní mikrobiota dětí narozených císařským řezem má celkově nižší mikrobiální diverzitu a opožděnou kolonizaci kmene *Bacteroidetes*. Nepřirozená kolonizace způsobená císařským řezem může přispět ke zvýšenému riziku některých imunitních onemocnění jako je astma a diabetes (Cardwell et al., 2008). Pro vytvoření zdravého imunitního

systemu, který hraje důležitou roli ve vytvoření normální střevní mikrobioty, je důležitá časná expozice širokému spektru mikrobů z okolního prostředí (Li et al., 2016).

Během prvního roku života je složení střevní mikrobioty nestálé a je ovlivněno především stravovacím režimem. V mateřském mléce je obsažen komplex oligosacharidů, který může podporovat růst a kolonizaci prospěšných bakterií jako je rod *Bifidobacterium*. Děti, které byly krmené dětskou výživou, mají střevní trakt častěji kolonizovaný potencionálními patogeny jako je *Escherichia coli* a *Clostridium difficile* (Li et al., 2016). Trvá zhruba do tří let věku, než se složení mikrobioty ustálí a odpovídá mikrobiotě dospělého člověka (Yatsunenکو et al., 2012). Během této doby se funkce genů střevního mikrobiomu kojenců mění od využití laktózy po rozložení polysacharidů, biosyntézu vitamínů a degradaci xenobiotik (Li et al., 2016).

Struktura střevní mikrobioty se mění s věkem. U zdravých starších jedinců se struktura mikrobioty různila, společným rysem je však vyšší množství patogenních enterobakterií a menší množství bifidobakterií. Studie Claessona et al. (2012) zjistila, že starší lidé (ve věku nad 65 let) kteří jsou závislí na dlouhodobé péči, mají vysoký podíl kmenu *Bacteroidetes* a druhů *Prabacteroides*, *Eubacterium*, *Anaerobacterium*, *Lactonifactor* a *Coprobacillus*, zatímco senioři, kteří žijí a starají se o sebe sami, mají více bakterií rodu *Firmucutes*, *Coprococcus* a *Roseburia*. Z toho vyplývá, že ve starším věku je složení mikrobioty výrazně ovlivněno životním stylem a nutričními návyky (Claesson et al., 2012, Li et al., 2016).

3.2.2.4 Různorodost střevní mikrobioty v závislosti na regionu

Yatsunenکو et al. (2012) uvádí, že existují rozdíly mezi složením a funkcí bakterií střeva napříč zeměpisnými regiony. Zjistili významné rozdíly u populace USA a lidmi žijícími v Malawi (Yatsunenکو et al., 2012). V tlustém střevě afrických dětí byl nalezen relativně vyšší počet specifických rodů bakterií (*Xylanibacter*, *Prevotella*, *Butyrivibrio* a *Treponema*), což může souviset s maximalizací získání energie z nestravitelných polysacharidů (De Filippo et al., 2010). U dětí pocházejících z afrického venkova bylo pozorováno výrazně vyšší množství bakterií rodu *Bacteroides* a méně bakterií kmenu *Firmicutes*, na rozdíl od dětí evropských (Li et al., 2016).

Wu et al. (2011) uvádí, že na základě vlivu dlouhodobého stravování lze rozdělit složení mikrobioty střeva na dva enterotypy. Enterotyp *Bacteroides* je spojován s dietou bohatou na živočišné bílkoviny a nasycené tuky, zatímco enterotyp *Prevotella* se vyskytuje u populací, jejichž strava je bohatá na sacharidy a jednoduché cukry. Stravovací rozdíly tedy mohou ve značné míře přispívat k variaci střevního mikrobiálního složení mezi městskými

společensvy a venkovskými oblastmi (Wu et al., 2011). Navíc, tak zvaná západní dieta způsobila vyhynutí některých střevních mikrobů z generace na generaci (Li et al., 2016).

3.2.2.5 Prebiotika a probiotika

Prebiotika a probiotika jsou využívána k úpravě střevní ekologie, což přispívá ke zlepšení lidského zdraví. Prebiotika jsou charakterizována jako nestravitelné části potravy, které stimulují růst nebo aktivitu jedné nebo více bakterií ve střevě (Li et al., 2016). Sacharidy včetně rezistentních škrobů se mohou dostat do tlustého střeva, aniž by byly narušeny trávicími enzymy a v tlustém střevě poté působí jako hlavní substráty pro růst bakterií se specifickými sacharolytickými enzymy. Stejně tak mucin a chondroitin sulfát, které jsou produkovány v organismu, mohou být fermentovány pomocí bakterií tlustého střeva. Nejčastěji užívanými prebiotiky jsou fruktooligosacharidy (FOS) a galaktooligosacharidy (GOS). Bylo zjištěno, že probiotické FOS selektivně zvýšily počet bifidobakterií, které pozitivně korelují se zlepšením tělesné váhy, endotoxemií a záněty (Cani et al., 2007). Byly také zjištěny pozitivní účinky probiotik na imunitní funkce, avšak důkazy o jejich úloze při léčbě neurologických poruch jsou vzácné a vyžadují další stanovení (Walton et al., 2012).

Probiotika jsou definována jako živé mikroorganismy, které mají příznivý účinek na zdraví hostitele, pokud jsou podávána v přiměřeném množství (Joint, 2002). Mezi celosvětově nejpoužívanější probiotika patří bakterie rodů *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*. Funkce probiotik ve zlepšování metabolických a imunitních poruch jsou již dobře prozkoumány, nové studie se proto zabývají účinky probiotik na léčbu neurologických onemocnění. Podávání *Lactobacillus rhamnosus* zmírnilo úzkostné chování myši modulací exprese receptorů γ -aminomáselné kyseliny v mozku, jež jsou závislé na vagových nervových systémech (Bravo et al., 2011). *Lactobacillus reuteri* může modulovat enterální nervový systém, avšak mechanismus účinku stále není známý (Joint, 2002, Li et al., 2016).

Bylo také zjištěno, že *Bifidobacterium infantis* vykazuje potenciální antidepresivní účinky potlačením uvolnění prozánětlivých cytokinů do krve a snížením koncentrace 5-hydroxyindoloctové a dihydroxyfenyloctové kyselin v mozku (Desbonnet et al., 2010). Studie Ochoa-Repéraz et al. (2010) ukázala, že *Bacteroides fragilis* je schopný ochránit centrální nervovou soustavu před demyelinizací, což však závisí na produkci kapsulárního polysacharidu A (Ochoa-Repéraz et al., 2010).

3.3 Polyfenoly a mikrobiota

Biologická dostupnost polyfenolů je v porovnání s mikro a makronutrienty relativně malá. Záleží však na složitosti jejich molekuly a stupni polymerace. Důležité strukturální parametry jsou molekulová hmotnost, glykosylace a esterifikace. Nízkomolekulární polyfenoly mohou být tedy snadno absorbovány v tenkém střevě. Zatímco oligomery a polymery polyfenolů jako jsou například kondenzované nebo hydrolyzovatelné taniny se mohou dostat do tlustého střeva téměř nezměněny. Nevstřebané polyfenoly se mohou hromadit v lumenu tlustého střeva a spolu s konjugáty vylučovanými žlučí jsou podrobeny střevní mikrobiotě. Mikrobiota tlustého střeva rozkládá složitější struktury na metabolity o nižší molekulové hmotnosti, které jsou lépe absorbovatelné a mohou být zodpovědné za účinky na lidské zdraví (Cardona et al., 2013). Nepřímým důkazem jejich absorpce přes bariéru střeva je zvýšení antioxidační kapacity po konzumaci potravin bohatých na polyfenoly (Scalbert et al., 2002). Jsou dvě vzájemné interakce mezi mikrobiotou a polyfenoly. Polyfenoly jsou podrobeny komplexnímu metabolismu a interagují s lidskými a mikrobiálními enzymy, což vede k tvorbě velkého množství cirkulujících metabolitů a produktů katabolismu. Na druhou stranu polyfenoly a jejich metabolity mohou ovlivňovat složení střevní mikrobioty pomocí různých interakcí (Hervert-Hernandez and Goñi, 2011).

3.3.1 Biotransformace polyfenolů ve střevě

Mikrobiota tlustého střeva ovlivňuje biologickou dostupnost polyfenolů hydrolytickým uvolněním aglykonů z O-glykosidů a jaterních O-glukuronidů. Polyfenoly se v rostlinách a potravinách vyskytují především jako O-glykosidy (například kvercetin a kempferol). Většina flavonoidů, kromě katechinů a proanthokyanidinů, je v potravinách ve formě glykosidu. Tato glykosylace ovlivňuje vstřebávání střevní stěnou. Absorpce kvercetinových glykosidů obsažených v cibulích byla vyšší (52 %) než kvercetinového aglykonu (24 %), to bylo zjištěno u dobrovolníků s ileostomií. Intestinální absorpce katechinů je ovlivněna také jejich esterifikací kyselinou galovou a absorpce kyseliny kávové esterifikací kyseliny chinové. Kyselina kávová je také mnohem lépe absorbována než její ester kyselina chlorgenová (Scalbert et al., 2002).

Většina těchto glykosidů je v kyselém prostředí žaludku, mukóze tenkého střeva a mikroorganismy tlustého střeva rozložena na aglykony (Stevens and Maier, 2016). Odhaduje se, že pouze 5–10 % celkového příjmu polyfenolů je absorbováno v tenkém střevě, většinou k absorpci dochází po dekonjugčních reakcích jako je například deglykosylace (Cardona et al., 2013). V tenkém střevě jsou absorbovány tedy pouze aglykony a některé glykosidy

(Manach et al., 2004). Po absorpci v tenkém střevě mohou být tyto látky podrobeny fázi I biotransformace (oxidace, redukce, hydrolýza) a fázi II (konjugace) v enterocytech a poté v hepatocytech, kde vznikají ve vodě rozpustné konjugované metabolity a poté jsou uvolněny do systémového oběhu, distribuovány do orgánů a vyloučeny močí. Resveratrol je pravděpodobně po absorpci tenkým střevem ve formě glukuronidového konjugátu. Ve stěně střeva bylo nalezeno malé množství sulfátu resveratrolu (Wenzel and Somoza, 2005).

Do tlustého střeva se dostanou polyfenoly, které nebyly vstřebány v předchozích částech trávicího traktu. Jakmile se polyfenoly dostanou do tlustého střeva jsou metabolizovány bakteriemi. Vedle schopnosti enzymů štěpit O-glykosidy a O-glukuronidy mají mikroorganismy tlustého střeva schopnost štěpit heterocyklické a aromatické kruhy flavonoidů a mohou dehydroxylovat, dekarboxylovat a dehydrogenovat alkenové skupiny (Stevens and Maier, 2016). Flavonoidní glykosidy (např. rutin), které nejsou absorbovány v horní části střeva, mohou být hydrolyzovány a aglykony se mohou absorbovat. Flavonoidní glukuronidy vyloučené žlučí mohou být také hydrolyzovány mikrobiotou a poté jsou výsledné aglykony reabsorbovány a tak vstupují do enterohepatického cyklu. Aglykony jsou dále metabolizovány na aromatické kyseliny s nízkou molekulovou hmotností (fenylylvalerová, fenylylpropionová, fenyloctová a benzoová), které jsou dobře absorbovány přes stěnu tlustého střeva (Scalbert et al., 2002). Například polyfenoly spojené s rhamnosou se musí dostat do tlustého střeva, kde jsou hydrolyzovány rhamnosidasami bakterií, aby mohly být absorbovány (Manach et al., 2004). Interindividuální rozdíly jsou vidět u metabolismu daidzeinu, kdy je někdy hlavním mikrobiálním metabolitem S(-)-equol. U jiných je hlavním metabolitem O-demethylangolensin nebo dihydrodaidzein. S-equol se vyznačuje lepšími biologickými vlastnostmi než samotný daidzein a má vyšší vazebnou afinitu k estrogenímu receptoru β (Bode et al., 2013).

3.3.2 Vliv polyfenolů na mikrobiom tlustého střeva

Rozdíly v biologické dostupnosti a aktivitě polyfenolů a jejich metabolitů mohou být způsobeny kromě individuálních změn denního příjmu polyfenolů i individuálními rozdíly ve složení lidské mikroflóry. Kompozice lidského střevního mikrobiomu může tedy modulovat vliv polyfenolů na zdraví hostitele (Etxeberria et al., 2013). Existují studie, které dokazují, že určité dávky některých polyfenolů mohou modifikovat složení střevní mikrobioty. Zatímco některé skupiny bakterií mohou být inhibovány, jiné mohou prospívat (Cardona et al., 2013). Protože některé fenolové sloučeniny byly identifikovány jako potenciální antimikrobiální látky s bakteriostatickým a baktericidním účinkem, mohly by být aplikovány jako antimikrobiální

činidla proti infekcím. Nicméně, nadbytečné množství polyfenolů ve stravě může inhibovat růst mikrobioty, která je pro tlusté střevo prospěšná. Suplementace těchto látek proto může mít nežádoucí účinek na lidské zdraví (Etxeberria et al., 2013).

Fenoly mění mikrobiom střeva a v důsledku toho je změněna rovnováha *Bacteroidetes/Firmicutes* (Cardona et al., 2013). Výsledky *in vitro* studie Tzounis et al. (2008) naznačují, že monomery flavan-3-olu, jako jsou (-)epikatechin a (+)katechin, mohou být schopny ovlivnit populaci bakterií v tlustém střevě. Zjistili, že (+)katechin výrazně inhiboval růst *Clostridium histolyticum* a podpořil růst *Escherichia coli* a fekálních bakterií *Clostridium coccooides-Eubacterium*, zatímco bakterie rodu *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* spp. zůstaly nezměněné (Tzounis et al., 2008). Bylo zjištěno, že podávání extraktů bohatých na proanthokyanidiny má podobný účinek. Složení bakterií tlustého střeva u potkanů, jejichž dieta byla doplněna extraktem z dealkoholizovaného červeného vína bohatého na proanthokyanidiny po dobu 16 týdnů, se změnilo. Před tímto experimentem převažovaly rody *Bacteroides*, *Clostridium* a *Propionibacterium* spp., zatímco po 16 týdnech došlo k převaze *Bacteroides*, *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* spp (Dolara et al., 2005). Cardona et al. (2013) uvádí, že resveratrol podpořil růst buněk bifidobakterií a laktobacilů u potkanů.

Cílem této práce bylo zjistit, jak jsou vybrané stilbenoidy katabolizovány bakteriemi tlustého střeva. Protože každý člověk má individuální složení střevní mikrobioty, vznikají z původních látek různé metabolity. Ty mohou mít odlišné účinky a také mohou různě interagovat s bakteriemi, jak prospěšnými, tak patogenními. Proto je třeba dalšího výzkumu, aby se objasnil vliv mikrobioty tlustého střeva na metabolismus stilbenoidů.

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

Stolice dárců

K analýze byly použity vzorky stolice od dárců držících 48 hodin nízko-polyfenolovou dietu, která vylučovala potraviny obsahující fenolické látky (káva, čaj, ovoce, zelenina, vláknina, obiloviny. Prakticky strava umožňuje příjem pouze masa, mléka a z rostlinných produktů oloupané vařené brambory, loupanou rýži a těstoviny).

Chemikálie

Chemikálie na přípravu média (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, kyselina chlorovodíková, byly zakoupeny od firmy Thermo Fisher Scientific (CZ), Sigma Aldrich (CZ) nebo Lach-Ner (CZ). Plyn OFN (oxygen free nitrogen) na ustanovení anaerobní atmosféry byl pořízen od firmy Messer (CZ), dimethylsulfoxid od firmy VWR (CZ).

Standardy stilbenoidů byly pod následujícími kódy objednány od výrobců: Piceatannol (ChemFaces CFS201503 98% – CHN), Thunalben (ChemFaces CFS201601 98% – CHN), Pinostilben (ChemFaces CFS201601 98% – CHN), Resveratrol (Sigma-Aldrich 2015-2020 – DE), Oxyresveratrol (Sigma-Aldrich 2015-2020 – DE), Batatasin III. (ChemFaces CFS201601 98% – CHN) Značený Resveratrol C13, který byl použit jako interní standard byl od firmy Sigma-Aldrich (CZ, 2015-2020).

Etyl-acetát pro extrakci vzorku byl od firmy Honeywell, Riedel-de Haën (DE), voda pro extrakce a kapalinovou chromatografii s hmotnostním spektrometrem (LC-MS) byla připravena systémem Mili Q (Direct Q 3 UV), methanol ABS. LC-MS (Biosolve – F), kyselina mravenčí (Fisher Scientific 98+% – B).

4.1.1 Přístroje

- Inkubátor 1000, Heidolph – DE
- Centrifuga Rotanta 460R – DE
- Ultra high pressure kapalinový chromatograf (UHPLC Ultimate 3000, Thermo Scientific – USA)
- Hmotnostní spektrometr s time of flight hmotnostním spektrometrem (MS Q-TOF Impact II Bruker Daltonic – DE)
- Temperovaný dusíkatý koncentrátor NSK2000-2 Hangzhou Miu Instruments – CHN
- Vodní purifikační systém pro Mili Q vodu Direct Q 3UV Milipore – USA

4.2 Metody

Vzorky byly fermentovány se stolicí celkem 5 dárců v plně faktoriálním designu experimentu s odpovídajícími kontrolami (byz polyfenolů), odebírány v definovaných časových intervalech a analyzovány s pomocí LC-MS.

4.2.1 Fermentace vzorků

Vzorky stolice byly získány od dárců, kteří drželi nejméně 48 hodin nízkopolyfenolovou dietu. Následně byly vzorky kultivovány v médiu a obohaceny roztoky komerčních standardů o koncentraci 10 mg/ml piceatannolu, thunalbenu, pinostilbenu, resveratrolu a oxyresveratrolu a batatasinu III rozpuštěných v DMSO (finální koncentrace látek v testu byla 1000krát nižší). Paralelně se sadou stilbenoidů byly fermentovány vialky obsahující pouze médium (kontrola) zaočkované stolicí – blank (BLA). Dále byl paralelně testován resveratrol, rozpuštěný jen v pufru, pro zjištění rozdílu rozkladu resveratrolu pouze v pufru a rozkladu v pufru s bakteriemi.

Byly připraveny následující zásobní roztoky: Uhličitanový pufr byl připraven rozpuštěním 1 g hydrogenuhličitanu amonného a 8.75 g hydrogenuhličitanu sodného ve 250 ml destilované vody. Roztok makromineralů byl získán 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 byl připraven 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 médium bylo vytvořeno smísením 1.125 g tryptonu v 225 ml

destilované vody, 56.25 µl mikromineralního roztoku, 112.5 ml uhličitanového pufru, 112.5 ml makromineralního roztoku a 562.5 µl 0.1% resazurinového roztoku. Fosfátový pufr byl vytvořen smícháním molárních roztoků 1/15M dihydrogenfosforečnanu draselného a 1/15M dihydrátu hydrogenfosforečnanu sodného a vyrovnáním na pH 7.0. Pracovní roztok byl připraven naředěním roztoku zásobního. Dále byly připraveny zásobní roztoky stilbenoidů v DMSO. Redukující roztok byl připraven rozpuštěním 125 mg cystein hydrochloridu, 0.8 ml 1M hydroxidu sodného a 125 mg sulfidu sodného ve 20 ml destilované vody.

Směs 120 mL fosfátového pufru a 500 mL média byly sterilovány varem a poté zchlazeny pod proudem dusíku. pH bylo vyrovnáno na pH 7.0 pomocí 6M kyseliny chlorovodíkové. 16.8 ml fermentačního média a 0.8 ml redukujícího roztoku bylo smíšeno se stolicí.

Z čerstvé stolice od každého dárce a fosfátového pufru byla vytvořena 32% suspenze a poté byla homogenizována ve stomacheru po dobu 30 s. Směs byla přefiltrována, byly z ní odebrány 2 ml, které byly smíšeny s 20 µl testovaného stilbenoidu. Do mikrozkušavek byly připraveny 4 kopie od každého vzorku. Odběru alikvotů probíhal v přesně daném časovém intervalu (0, 2, 4, 8, 24 a 48 hodin), fermentace byla provedena na horizontální třepačce teplotě 37°C. Skladování vzorků probíhalo při -80 °C.

4.2.2 Čistění vzorků

Do vzorků bylo přidáno 25 µl značeného resveratrolu 13C o koncentraci 2 µg/ml. Pvoťé vzorky byly dvakrát extrahovány po přidání 2.5 ml ethyl-acetátu a 2 ml Mili Q vody, následně byly vortexovány (Vortex Phoenix Instrument RS-VF10 – DE) a centrifugovány (centrifuga Rotanta 460R – DE) po dobu 5 minut při 4600 otáčkách. Ethylacetátová frakce byla odebírána do vialky. Po další vortexaci a centrifugaci byla opět odebrána ethylacetátová část a přidána k předchozí frakci. Poté byl ethylacetátový extrakt odpařen proudem dusíku. Po odpaření byl odparek rozpuštěn v 1 ml methanolu s 1% kyselinou mravenčí (v/v) a skladován při -80°C do analýzy.

4.2.3 Měření vzorků

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

Chromatografie byla provedena na Kinetex koloně (1.7 mm F5 100 Å 100x2.1 mm, Phenomenex – USA) s použitím UPLC vody a methanolu s kyselinou mravenčí (0,1 %) jako rozpouštědla A a B. V čase 0 byl průtok mobilní fáze A a B v poměru 8:2. V 3–6 minutě byl

poměr eluentů 1:1, 6-15 minuta byla pouze mobilní fáze B.. V 15–16 minutě byl změněn poměr na 8:2. V 16-20 minutě byla udržována rovnováha stále v poměru 8:2

Rychlost průtoku byla 0,2 ml/min, teplota kolony byla udržována na 35° C a objem nástřiku byl 5 µl.

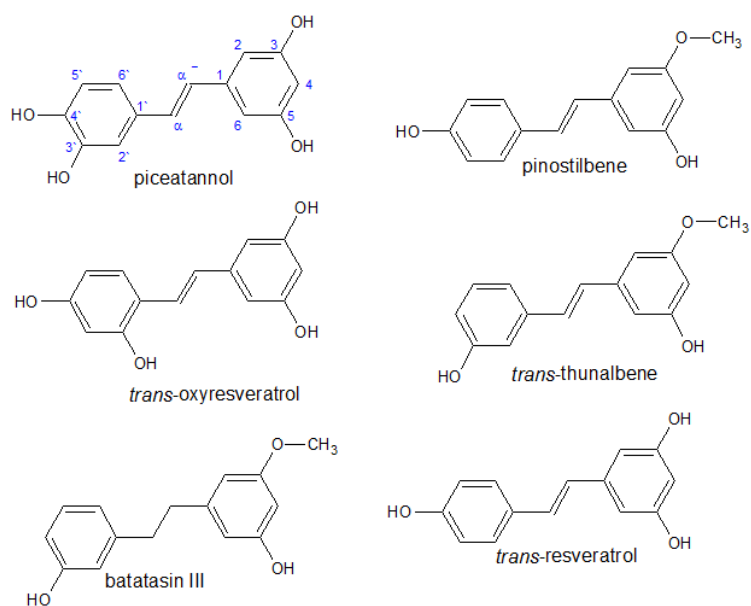
Ionizace byla provedena v negativním módu, v režimu full scan. Parametry ionizačního zdroje: end plate offset: 500 V, capillary: 3 000 V, tlak nebulizačního plynu: 0,3 Barů, průtok sušícího plynu: 4L/min , teplota zdroje: 250 °C. Spektra byla snímána při frekvenci 1 Hz a měřena v rozsahu 500-1 500 m/z.

Data byla zpracována pomocí MS Otof Series 4.0, (Bruker Daltonics – Německo) a Chromeleon Xpress (Thermo Fisher Scientific – USA), HyStar verze 3.2 SR4, DataAnalysis 4.3 (Bruker Daltonics – Německo) a TASQ 2.2. (Bruker Daltonics – Německo).

4.2.4 Statistické zpracování

Data byla zpracována v programu International Business Machines SPSS Statistics 24.0. Vzhledem k tomu, že se jednalo o semikvantitativní analýzu, nebyla data statisticky zpracována, ale byla vyjádřena pouze v grafech formou průměru, střední a chybové úsečky.

5 Výsledky a diskuze



Obrázek 8: Přehled stilbenoidů použitých v analýze

Jednotlivé stilbenoidy, které jsme analyzovali, mají podobnou strukturu (obr. 8). Všechny jsou tvořeny dvěma aromatickými jádry spojenými můstkem. Na tyto aromatické kruhy jsou navázány tři nebo čtyři hydroxylové skupiny. Pinostilben, *trans*-thunalben a batatasin se liší od ostatních přítomností methylové skupiny. Batatasin III se odlišuje také nepřítomností dvojné vazby na spojovacím můstku.

Z následujících znázornění katabolismu jednotlivých stilbenoidů (obr. 9) lze vyvodit, jak mikrobiota tlustého střeva tyto látky rozkládá. V našem experimentu nebyl pozorován rozpad aromatických kruhů, ale kvůli použité metodě extrakce ho nemůžeme vyloučit. Metabolity, které byly redukovány na etheňovém můstku, už nejsou dále metabolizovány a tvoří konečné produkty. Z metabolismu batatasinu III a pinostilbenu lze dojít k názoru, že dvojná vazba zřejmě umožňuje demethylaci uhlíku C5, zatímco po redukcii spojovacího můstku je tato reakce stericky blokována. Methoxy- skupiny jsou tedy demethylovány, zatímco hydroxylové skupiny zůstávají stabilní. Výjimkou je thunalben, kde dochází k demethylaci methoxylové skupiny, ale dvojná vazba zůstává, vznikne tak batatasin III. Dehydroxylované stilbenoidy (dihydro- metabolity) jsou konečným produktem rozkladu mikroorganismy, ale původní stilbenoidy nejsou kompletně rozloženy a stále jsou přítomny i po 48 hodinách.

Stabilita látek

Batatasin III byl při fermentacích stabilní a během 48 hodin nebyl bakteriemi výrazně katabolizován, stejně tak je stabilní i pinostilben a thunalben. Oxyresveratrol, resveratrol i piceatannol byly rozkládány pozvolna (obr. 9).

Přehled katabolitů

Resveratrol se vyskytuje u batatasinu III stabilně už od nulté hodiny, zřejmě se ve vzorku vyskytoval jako nečistota, nebo se tvoří od samého začátku (obr. 9). Z batasinu III je vytváří jen dihydroresveratrol. Předpokládaný metabolit nevzniká (obr. 15).

Z oxyresveratrolu vznikaly dva metabolity (dihydrooxyresveratrol a dihydroresveratrol) (obr. 9, 14).

Z piceatannolu (obr. 12) zřejmě vzniklo pět sloučenin, dihydro-3,5,3'-trihydroxystilben nebo dihydroresveratrol, resveratrol nebo 3,5,3'-trihydroxy-*trans*-stilben a dihydropiceatannol. U jednoho dárce vznikl z piceatannolu jen dihydropiceatannol (obr. 16). To by však platilo jen tehdy, pokud by se odštěpoval hydroxyl na kruhu A. Také je možné, že se odštěpuje hydroxyl na kruhu B. V tomto případě by mohly vzniknout jiné metabolity. Jelikož 3,5,3'-trihydroxy-*trans*-stilben a *trans*-resveratrol mají molekulovou hmotnost shodnou, není možné zjistit, zda vznikají oba dva metabolity nebo pouze jeden z nich. Spíše předpokládáme, že vznikne *trans*-resveratrol a z něj poté dihydroresveratrol. Pokud bychom chtěli upřesnit, která látka vzniká, bylo by zapotřebí použít NMR spektroskopie. Dihydroresveratrol a dihydro-3,5,3'-piceatannol jsou také látky se stejným m/z a to 229,0864, tudíž nemůžeme rozlišit, která z těchto dvou látek ve skutečnosti z piceatannolu vzniká.

V našem experimentu byl zkoumán metabolismus v modelu tlustého střeva, zatímco Setoguchi et al. (2014) analyzoval metabolity piceatannolu v moči a plazmě. Uvádí, že piceatannol podávaný potkanům intravenózně byl metabolizován na glukuronidový konjugát a byl vylučován močí. Jeho koncentrace v plazmě byla udržována na vyšší úrovni než hladina jeho konjugátu. Po gastrickém podání piceatannolu byl nejhojnějším metabolitem monoglukuronid piceatannolu (Setoguchi et al., 2014).

Z pinostilbenu vznikly tři metabolity (obr. 12). Odstraněním methylu na pátém uhlíku beta kruhu vznikl *trans*-resveratrol a odstraněním celé methoxy- skupiny daly bakterie vznik 3,4'-dihydroxy-*trans*-stilbenu. U dihydropinostilbenu po redukci dvojně vazby zůstala methoxy- skupina navázaná na pátém uhlíku beta kruhu. Dále pak z *trans*-resveratrolu redukcí dvojně vazby na methylenovém můstku vznikl dihydroresveratrol.

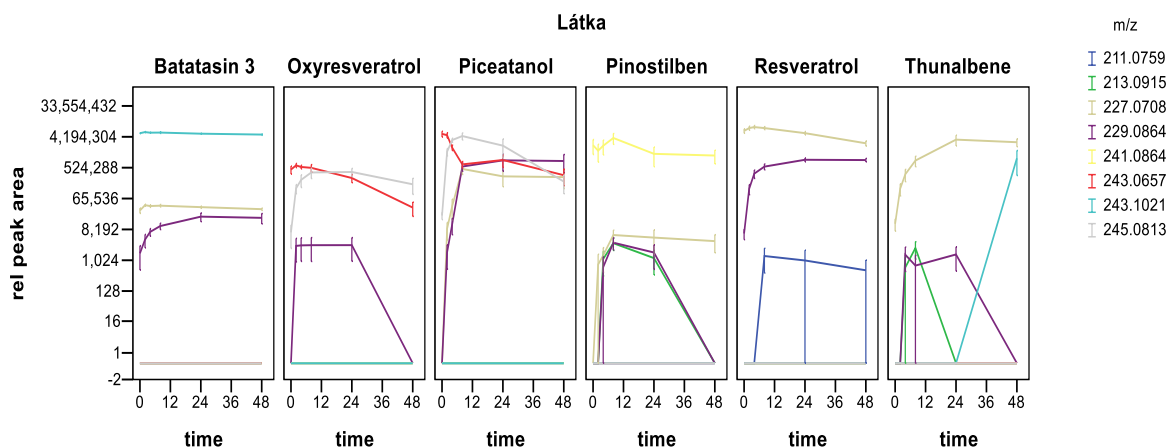
Z resveratrolu vzniká redukcí dvojně vazby úměrně v průběhu času dihydroresveratrol. Bakterie resveratrol redukují nejintenzivněji do 24 hodin, poté jeho množství stoupá jen zvolna (obr. 9, 13). U *trans*-thunalbenu není vidět mateřská molekula (obr. 9). Bakterie u něj odštěpily methylovou skupinu za vzniku 3,5,3'-trihydroxy-*trans*-stilbenu. Dále vznikal dihydro-3,5-dihydroxystilben a batatasin III, který vzniká redukcí dvojně vazby na spojovacím můstku (obr. 9, 11). Na základě studie Bode et al. (2010) jsme předpokládali, že *trans*-resveratrol se bude metabolizovat na tři látky, a to dihydroresveratrol, 3,4'-dihydroxy-*trans*-stilben a pinosylvin (3,5-dihydroxy-*trans*-stilben). A dále odstraněním dvojně vazby u 3,4'-dihydroxy-*trans*-stilbenu vznikne lunularin. Výsledky Bode et al. (2013) naznačují, že lunularin může být tvořen dvěma různými cestami. První způsob je dehydroxylací dihydroresveratrolu a druhý přes redukcí 3,4'-dihydroxy-*trans*-stilbenu. Obě cesty mohou být zprostředkovány jednotlivými mikroorganismy nebo závisí na přítomnosti více různých bakterií (Bode et al., 2013). V jejich studii bylo 8,1–62,7 % *trans*-resveratrolu metabolizováno mikrobiotou. Mikrobiální metabolity nalezené v *in vitro* modelu byly detekovány ve vzorcích moči, zejména dihydroresveratrol a lunularin. Dihydroresveratrol byl hlavním produktem u devíti dobrovolníků, zatímco lunularin jen u tří. 3,4'-dihydroxy-*trans*-stilben byl detekován v moči u všech lidí, kteří produkovali jako hlavní metabolit lunularin. Jeden dobrovolník produkoval lunularin i dihydroresveratrol jako hlavní metabolity. U dalšího produkovaly bakterie malé množství těchto dvou metabolitů, a navíc větší množství 3,4'-dihydroxy-*trans*-stilbenu. V naší studii vznikl pouze dihydroresveratrol (obr. 13).

Po podání dávky roztoku bylo 8,3– 2,7 % daného resveratrolu izolováno v moči jako mikrobiální metabolit. U některých subjektů byl hlavním vytvořeným mikrobiálním metabolitem dihydroresveratrol (Walle et al., 2004). Walle také uvádí, že kromě moči byl dihydroresveratrol identifikován v plazmě potkana a hlavně z inkubátů resveratrolu s fekálními bakteriálními druhy savců (Walle, 2011). Data Bode et al. (2013) ukazují, že bakterie střev snadno přeměňují *trans*-resveratrol a proto značně přispívají k jeho metabolickému osudu u lidí. *Trans*-resveratrol obsahuje hydroxylovou skupinu v poloze *meta*- místo polohy *ortho*-, která je přítomna u polyfenolů, u kterých bylo prokázáno, že jsou dehydroxylovány střevními bakteriemi. Například bakterie *Eggerthella lenta* má schopnost dehydroxylovat *trans*-resveratrol v anaerobních inkubačních experimentech. (Bode et al., 2013).

U *trans*-oxyresveratrolu byl pozorován vznik dihydroxyresveratrolu redukcí dvojně vazby v ethenovém můstku. Pouze u jediného dárce došlo zároveň k redukcí dvojně vazby

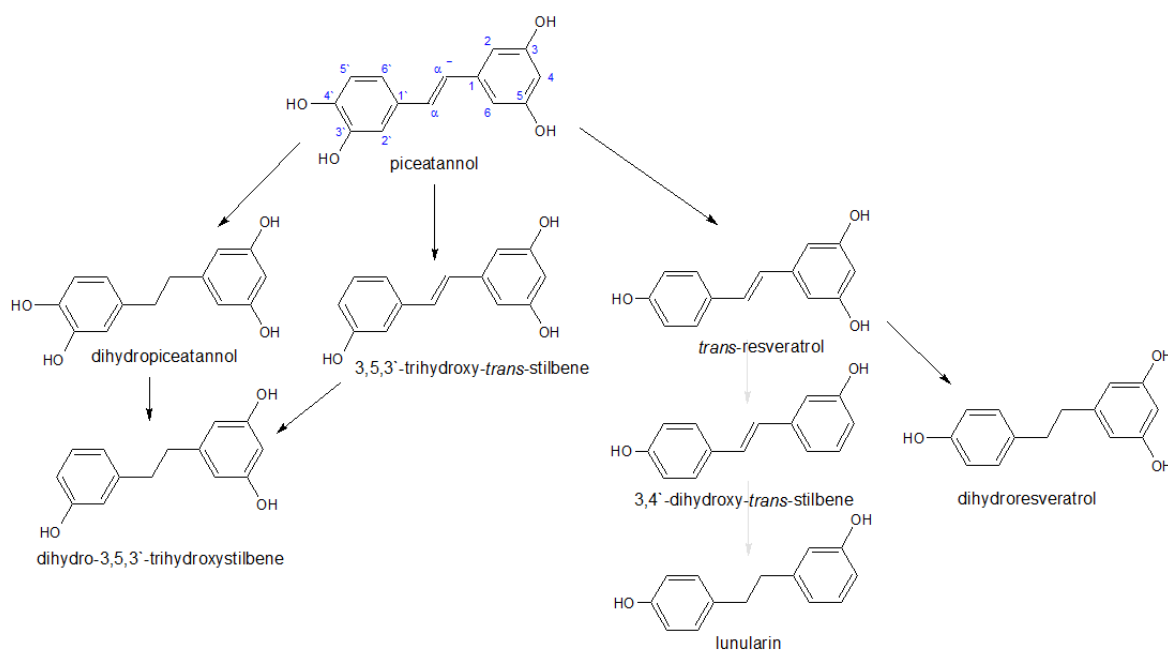
a dehydroxylaci hydroxylové skupiny v poloze *ortho*- (obr. 9, 14). Tedy pouze u prvního dárce vznikl z *trans*-oxyresveratrolu dihydroresveratrol (obr. 16).

U vzorku batatasinu III (obr. 15) bylo předpokládáno, že dojde k demethylaci na uhlíku C5. Demethylaci zřejmě umožňuje dvojná vazba na spojovacím můstku, která u batatasinu III není. Z tohoto stilbenoidu tedy nevznikal přepokládaný metabolit. Vznikal pouze dihydroresveratrol.

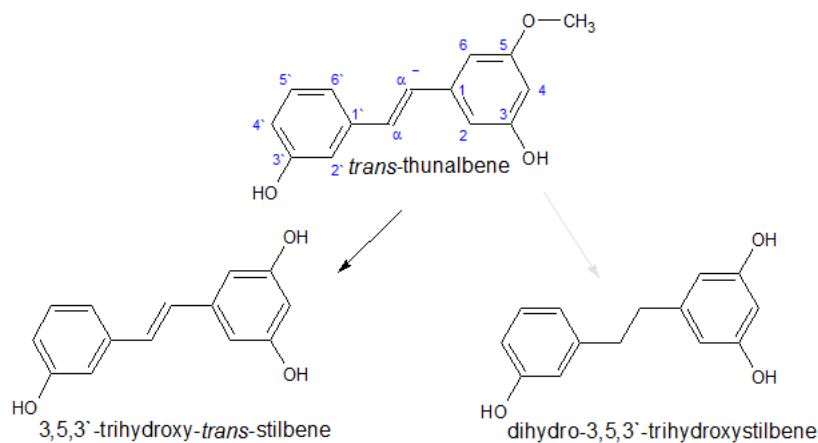


m/z	Stilbenoid
211.0759	Pinosylvin
213.0915	Dihydro-3,5-dihydroxystilben
227.0708	Resveratrol
229.0864	Dihydroresveratrol/Dihydro-3,5,3'-trihydroxystilben
241.0864	Pinostilben
243.0657	Oxyresveratrol/Piceatanol
243.1021	Batatasin III
245.0813	Dihydrooxyresveratrol/Dihydro-piceatannol

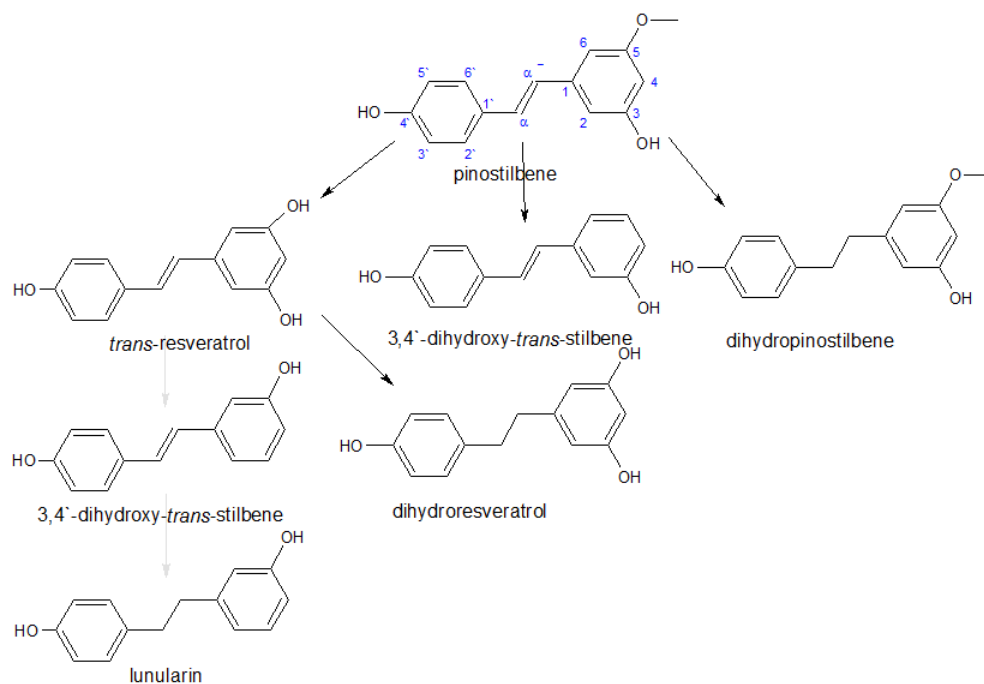
Obrázek 9: Fermentační profily stilbenoidů ve statických inkubacích zaočkovaných lidskou stolicí (n=5), vertikální úsečka SEM (střední chyba průměru)



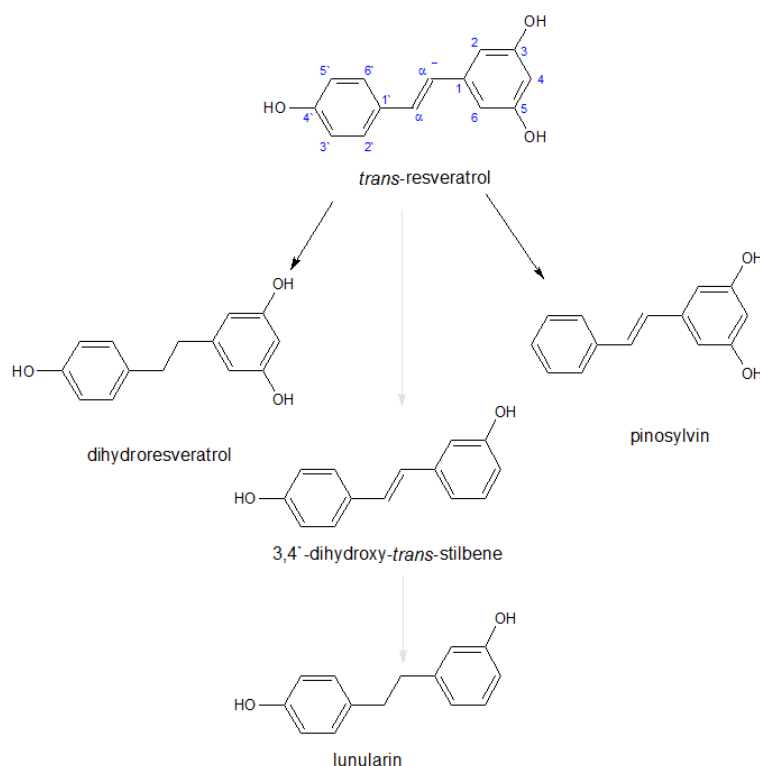
Obrázek 10: Katabolismus piceatannolu v modelu tlustého střeva na základě LC-QTOF analýzy (šedě označené metabolity a dráhy jsou teoreticky předpokládány nebo nalezené v literatuře, ale v naší studii nepozorované).



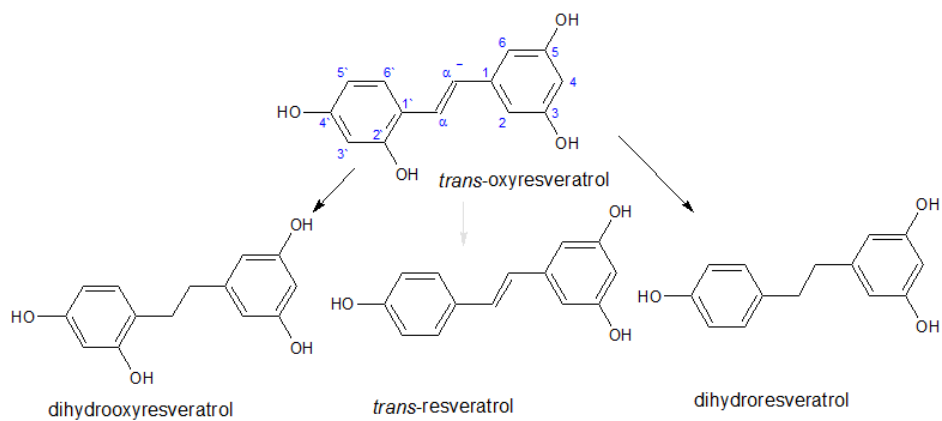
Obrázek 11: Katabolismus *trans*-thunalbenu (šedě označené metabolity a dráhy jsou teoreticky předpokládány nebo nalezené v literatuře, ale v naší studii nepozorované).



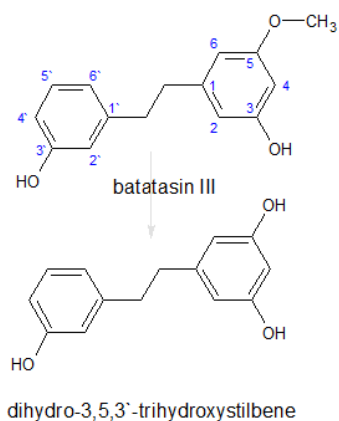
Obrázek 12: Katabolismus pinostilbenu (šedě označené metabolity a dráhy jsou teoreticky předpokládáné nebo nalezené v literatuře, ale v naší studii nepozorovaně).



Obrázek 13: Katabolismus *trans*-resveratrolu (šedě označené metabolity a dráhy jsou teoreticky předpokládáné nebo nalezené v literatuře, ale v naší studii nepozorovaně).



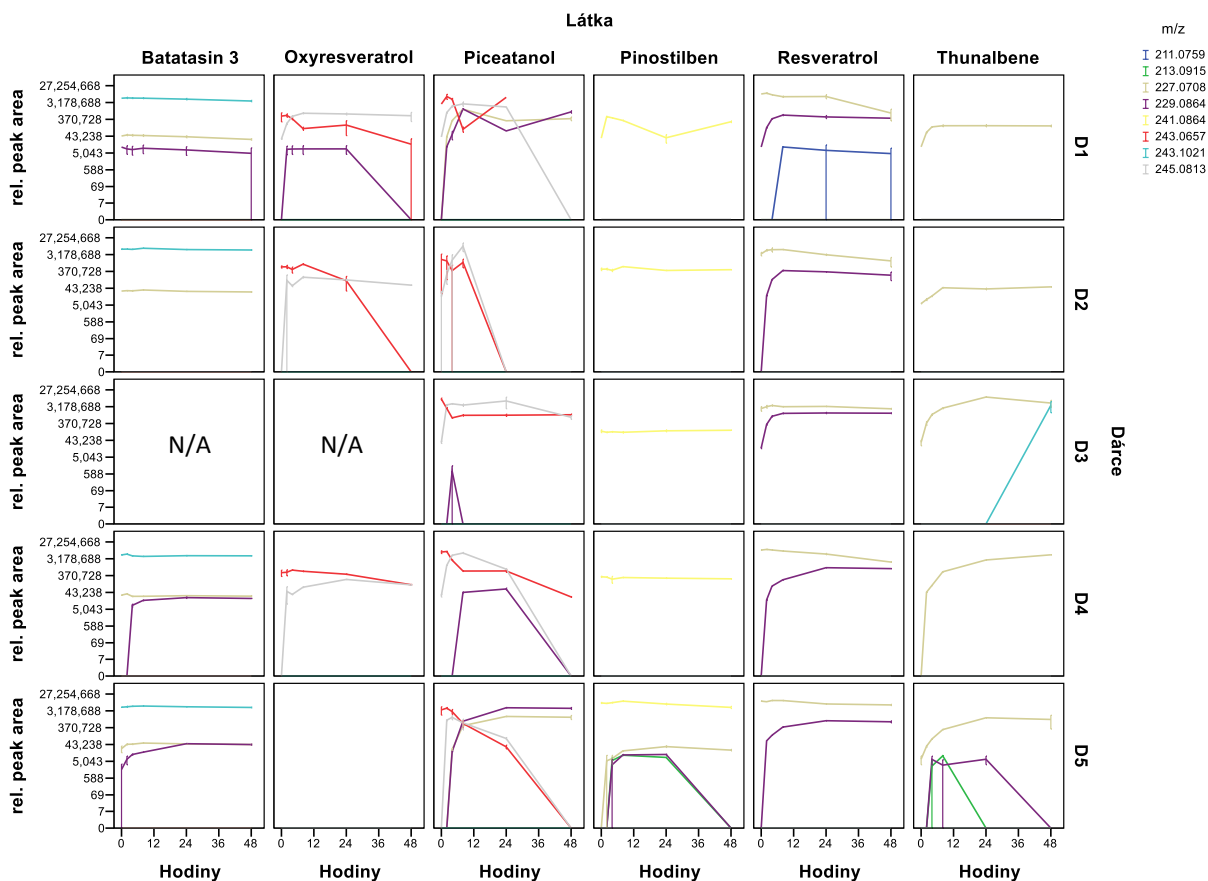
Obrázek 14: Katabolismus oxystilbenolu (šedě označené metabolity a dráhy jsou teoreticky předpokládáné nebo nalezené v literatuře, ale v naší studii nepozorované).



Obrázek 15: Katabolismus batatasinu III (šedě označené metabolity a dráhy jsou teoreticky předpokládáné nebo nalezené v literatuře, ale v naší studii nepozorované).

Interindividuální rozdíly mezi dárci

Byly zjištěny významné rozdíly ve schopnostech mikrobioty tlustého střeva metabolizovat jednotlivé stilbenoidy. To naznačuje, že u každého jedince mohou vznikat jiné metabolity a v jiném poměru, což může vést i k jiným biologickým účinkům stilbenoidů ze stravy.



m/z	Stilbenoid
211.0759	Pinosylvin
213.0915	Dihydro-3,5-dihydroxystilben
227.0708	Resveratrol
229.0864	Dihydroresveratrol/Dihydro-3,5,3'-trihydroxystilben
241.0864	Pinostilben
243.0657	Oxyresveratrol/Piceatanol
243.1021	Batatasin III
245.0813	Dihydroxyresveratrol/Dihydropiceatannol

Obrázek 16: Interindividuální rozdíly v katabolismu jednotlivých stilbenoidů (n=5), (N/A – nebylo analyzováno), vertikální úsečka SEM

U třech ze čtyř subjektů byl batatasin III katabolizován na dihydroresveratrol. Profil metabolitů je všech dárců podobný (obr.16). Profil u pinostilbenu je také u všech dárců podobný. Pinostilben je však poměrně stabilní a jeho intenzita v průběhu 48 hodin výrazně neklesá. Pátý dárců se liší od ostatních tím, že vytváří jako jediný metabolit - dihydroresveratrol, resveratrol, dihydro-3,5-dihydroxystilben.

Thunalben je u všech dárců velmi stabilní. Liší se jen třetí a pátý dárců, jinak jsou všechny profily podobné. Mateřská molekula na grafu vidět není. U třetího dárců od 24 hodiny znázorněn prudký nárůst batatasinu III. U pátého dárců vznikají jiné katabolity. Dihydroresveratrol, který od 24 hodiny prudce klesá, což naznačuje, že je dále bakteriemi rozkládán a dále dihydro-3,5-dihydroxystilben, který je do 24 hodin rozložen. Je možné, že dihydro-3,5-dihydroxystilbenu je částečně přeměňována na dihydroresveratrol.

U oxyresveratolu jsou větší interindividuální rozdíly. První dárců se liší od ostatních a stejně jako u batatasinu III vytváří dihydroresveratrol. U prvního a druhého dárců je oxyresveratrol bakteriemi celý spotřebován do 48 hodin, u čtvrtého dárců není rozkládán téměř vůbec. U posledního dárců nebyl ani v jedné fermentaci identifikován metabolit.

U piceatannolu bakterie vytváří největší množství metabolitů. Bakterie všech dárců kromě druhého vytváří z piceatannolu dihydroresveratrol (nebo dihydro-3,5,3'-trihydroxystilben). U druhého dárců je piceatannol rychle metabolizován, stejně tak jako vytvořený dihydropiceatannol. U třetího a čtvrtého dárců byl stabilní a bakterie ho nemetabolizovaly rychle. U pátého dárců je tento stilbenoid do 48 hodin bakteriemi kompletně rozložen a vznikalo z něj velké množství dihydroresveratrolu/dihydro-3,5,3'-trihydroxystilbenu a dihydropiceatannolu. U některých dárců jsou tyto dva metabolity rozkládány dál, ale u dvou lidí (dárců 1 a 3) zůstávaly stabilní. Dihydro-3,5,3'-trihydroxystilben mizí rychleji, což může znamenat, že vzniká z dihydropiceatannolu (obr. 16).

První a pátý dárců se podobají v katabolismu piceatannolu, ale liší se v katabolismu thunalbenu a pinostilbenu. Obecně se pátý dárců liší od všech ostatních, z pinostilbenu a thunalbenu vytváří jako jediný dihydroresveratrol.

U všech pěti dárců je průběh katabolismu resveratrolu podobný. Dochází k intenzivní redukci dvojnásobné vazby a tím ke vzniku dihydroresveratrolu, zejména v prvních osmi hodinách. Poté je jeho intenzita stabilní nebo mírně klesá. Liší jen první dárců, kde z resveratrolu vzniká pinosylvin.

Interindividuální rozdíly metabolismu *trans*-resveratrolu pozorované ve studii Bode et al. (2013) byly úzce spjaty s mikrobiální diverzitou. Jeden fekální vzorek vůbec neprodukoval

z *trans*-resveratrolu dihydroresveratrol, což naznačuje nižší relativní výskyt sekvencí bakterií *Firmicutes* a vyšší množství sekvencí z *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* (*Bifidobacteriaceae* a *Cornibacteriaceae*), *Verrucomicrobia* a *Cyanobacteria* (Bode et al., 2013). Ve studii Bode et al. (2013) tedy pouze u jednoho ze sedmi dárců vznikal jen dihydroresveratrol, naopak v naší studii z *trans*-resveratrolu nevznikal žádný jiný metabolit než tento. To může být způsobeno stejným složením mikrobioty u všech pěti dárců. Abychom si tuto domněnku ověřili, museli bychom udělat PCR analýzu na detekci bakteriálních kolonií.

Dalším rozdílem v naší studii oproti studii Bode et al. (2013) bylo jiné složení fermentačního média a také jiný extrakční postup. Extrakce byla provedena třikrát za sebou, zatímco v naší studii byla provedena pouze dvakrát. Také přečištění vzorku pro LC-MS analýzu bylo odlišné. V našem případě byly vzorky čištěny pomocí extrakce do ethylacetátu, při použití ¹³C resveratrolu jako interního standardu, zatímco ve studii Bode et al. (2013) byl použit ethylacetát obsahující 5 % isopropanolu a 5 % 1-butanolu, což jsou látky více nepolární. Jako interní standard byl použit *trans*-piceatannol. Podle této studie vznikající pinosylvin, 3,4'-dihydroxy-*trans*-stilben a lunularin jsou kvůli ztrátě hydroxylového zbytku více polární než dihydroresveratrol, tudíž by měly spíše přecházet do ethylacetátu než do vody.

Ve studii Azorín- Ortuño et al. (2011), kde byl studován metabolismus resveratrolu v tlustém střevě prasete, byl jako nejhojnější mikrobiální metabolit nalezen také dihydroresveratrol (Azorín-Ortuño et al., 2011). Dihydroresveratrol byl již popsán jako metabolit resveratrolu a redukce dvojné vazby mezi uhlíky střevní mikroflórou byla prokázána i u jiných dietních sloučenin, jako jsou isoflavony a hydroxycinnamáty. Přítomnost hydroxylových skupin dovoluje polyfenolům spojení s proteiny a dalšími živinami. Rozpustnost těchto sloučenin určuje jejich fyziologické účinky. Komplexy těchto sloučenin, které udržují rozpustnost, mohou být absorbovány v tenkém střevě, zatímco nerozpustné komplexy jsou vyloučeny stolicí (Bravo et al., 1994). Podle studie Walle et al. (2004) exkrece celkových metabolitů močí po podání radioaktivně značené dávky ukázala, že bylo absorbováno přibližně 75% perorálně nebo intravenózně podaného resveratrolu. Jedná se o neobvykle vysokou absorpci polyfenolu, zvláště s ohledem na špatnou rozpustnost této sloučeniny ve vodě (Walle et al., 2004). Metabolity resveratrolu mohou mít fyziologické účinky, které se významně liší od resveratrolu. Bylo popsáno, že dihydroresveratrol stimuluje proliferaci buněčné linie MCF-7, tedy hormon-dependentního nádoru prsu v pikomolární koncentraci (10^{-14} až 10^{-17}), ve které je *trans*-resveratrol neaktivní. U dvou hormon-rezistentních buněčných linií rakoviny prsu MDA-MB-231 a BT-474 však tento proliferační

efekt pozorován nebyl. Nicméně, tato sloučenina vykazovala cytotoxický účinek ve vysokých koncentracích na všechny tři typy rakovinných buněk. Některé další přírodní fytoestrogeny, včetně *trans*-resveratrolu, mají vysokou schopnost superagonismu, ale i ty nejsilnější jsou méně aktivní než dihydroresveratrol. Například genistein dosáhne nejvyšší proliferační aktivity v buňkách MCF-7 pouze v koncentracích 10^{-6} M na rozdíl od 10^{-10} M u dihydroresveratrolu. Vzhledem k relativně nízké molekulové hmotnosti a struktuře, která je jen vzdáleně podobná 17 β -estradiolu (nesteroidní syntetický estrogen), nebyl tento účinek předpokládán (Gakh et al., 2010).

Odštěpení hydroxylových skupin hraje roli v mikrobiální transformaci sloučenin, jako jsou lignany, fenolové kyseliny a žlučové kyseliny (Braune et al., 2009). Bode et al. (2013) uvádí, že dehydroxylace resveratrolu se vyskytla u resorcinové části, takže jedna ze dvou hydroxylových skupin v pozici *meta*- byla eliminována. Dehydroxylace byla zatím pozorována pouze u monohydroxylových nebo *orto*-dihydroxylofenolových skupin, například při transformaci ferulových kyselin nebo lignanů lidskými intestinálními bakteriemi (Braune et al., 2009). Z testovaných bakterií pouze *Slackia equolifaciens* a *Adlercreutzia equolifaciens* z rodu *Coriobacteriaceae* produkovaly dihydroresveratrol, což je ve shodě se studií Junga et al. (2009). Nicméně, *A. equolifaciens* produkovala dihydroresveratrol pouze ve stopovém množství, zatímco *S. equolifaciens* úplně převedla *trans*-resveratrol během 96 hodin fermentace. Délka fermentace u Bode et al. (2013) byla o 48 hodin delší než v našem experimentu. Pokud bychom vzorky fermentovali déle, je možné, že by *trans*-resveratrol byl bakteriemi zcela spotřebován. Jung et al. (2009) dále ukázali, že *Bacteroides uniformis* ATCC 8492 je schopna produkovat dihydroresveratrol, což vede k názoru, že i další bakterie z rodu *Bacteroides* spp. mohou hrát roli v bakteriálním metabolismu resveratrolu (Jung et al., 2009).

6 Závěr

Cílem této práce byla fermentace fermentace šesti vybraných stilbenoidů (resveratrol, oxyresveratrol, pinostilben, piceatannol, thunalben a batatasin III) v *ex vivo* modelu lidskou stolicí. Z batatasinu III vznikal jeden metabolit. U resveratrolu a oxyresveratrolu byly identifikovány pouze dva metabolity. Z thunalbenu bakterie některých dárců vytvářely tři metabolity. Pinostilben tvořil metabolity čtyři a z piceatannolu jich vzniklo pět. Tyto metabolity vznikaly pomocí dehydroxylace, demethylace a oxidace dvojně vazby. Nejvíce metabolitů vznikalo u piceatannolu a pinostilbenu, zatímco u batatasinu III nebyl identifikován jediný metabolit. Byla identifikována redukce dvojně vazby u piceatannolu, pinostilbenu, *trans*-resveratrolu a *trans*-oxyresveratrolu. U thunalbenu a pinostilbenu došlo k demethylace methoxy skupiny na pátém uhlíku beta kruhu. Ztráta této skupiny byla zřejmě podmíněná přítomností dvojně vazby na spojovacím ethenovém můstku.

Metabolitů ale vzniká (zřejmě) relativně málo v poměru k mateřské molekule, ačkoliv vzhledem k tomu, že nejsou k dispozici standardy přesná kvantifikace nebyla možná a mateřská molekula je ve vysoké míře v lumenu tlustého střeva k dispozici pro transport přes epitheliální stěnu.

V této studii bylo potvrzeno, že mikrobiota tlustého střeva je schopna metabolizovat sledované stilbenoidy. Námi testované stilbenoidy jsou látky strukturně podobné, ale u každé bylo jiné spektrum metabolitů. Je zřejmé, že bakterie střeva se u každého jedince mohou lišit, a tudíž dávají vznik jiným látkám. Vzniklé metabolity mohou mít odlišné biologické účinky než původní látky. Proto jedna látka může mít různý benefit na lidské zdraví.

To by mělo být bráno v úvahu při studiích biologických účinků stilbenoidů na člověka. Stále je potřeba dalšího výzkumu, a to zejména *in vivo* studií pro potvrzení nebo vyvrácení těchto účinků.

7 Seznam použité literatury

- Aggarwal, B. B., Bhardwaj, A., Aggarwal, R. S., Seeram, N. P., Shishodia, S. and Takada, Y. (2004) 'Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies', *Anticancer research*, 24(5A), pp. 2783-2840.
- Aluyen, J. K., Ton, Q. N., Tran, T., Yang, A. E., Gottlieb, H. B. and Bellanger, R. A. (2012) 'Resveratrol: potential as anticancer agent', *Journal of dietary supplements*, 9(1), pp. 45-56.
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., Fernandes, G. R., Tap, J., Bruls, T. and Batto, J.-M. (2011) 'Enterotypes of the human gut microbiome', *nature*, 473(7346), pp. 174.
- Azorín-Ortuño, M., Yáñez-Gascón, M. J., Vallejo, F., Pallarés, F. J., Larrosa, M., Lucas, R., Morales, J. C., Tomás-Barberán, F. A., García-Conesa, M. T. and Espín, J. C. (2011) 'Metabolites and tissue distribution of resveratrol in the pig', *Molecular nutrition & food research*, 55(8), pp. 1154-1168.
- Bavaresco, L., Vezzulli, S., Battilani, P., Giorni, P., Pietri, A. and Bertuzzi, T. (2003) 'Effect of ochratoxin A-producing Aspergilli on stilbenic phytoalexin synthesis in grapes', *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(21), pp. 6151-6157.
- Belguendouz, L., Fremont, L. and Linard, A. (1997) 'Resveratrol inhibits metal ion-dependent and independent peroxidation of porcine low-density lipoproteins', *Biochemical pharmacology*, 53(9), pp. 1347-1355.
- Bode, L. M., Bunzel, D., Huch, M., Cho, G.-S., Ruhland, D., Bunzel, M., Bub, A., Franz, C. M. A. P. and Kulling, S. E. (2013) 'In vivo and in vitro metabolism of trans-resveratrol by human gut microbiota', *The American journal of clinical nutrition*, 97(2), pp. 295-309.
- Bonda, C., Zhang, J. and Pavlovic, A. (2011) 'The photostability and photostabilization of trans-resveratrol', *Cosmetics and toiletries*, 126(9).
- Braune, A., Bunzel, M., Yonekura, R. and Blaut, M. (2009) 'Conversion of dehydrodiferulic acids by human intestinal microbiota', *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(8), pp. 3356-3362.
- Bravo, J. A., Forsythe, P., Chew, M. V., Escaravage, E., Savignac, H. M., Dinan, T. G., Bienenstock, J. and Cryan, J. F. (2011) 'Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(38), pp. 16050-16055.
- Bravo, L., Abia, R. and Saura-Calixto, F. (1994) 'Polyphenols as dietary fiber associated compounds. Comparative study on in vivo and in vitro properties', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(7), pp. 1481-1487.
- Buiarelli, F., Coccioli, F., Jasionowska, R., Merolle, M. and Terracciano, A. (2007) 'Analysis of some stilbenes in Italian wines by liquid chromatography/tandem mass spectrometry', *Rapid communications in mass spectrometry*, 21(18), pp. 2955-2964.
- Burns, J., Yokota, T., Ashihara, H., Lean, M. E. J. and Crozier, A. (2002) 'Plant foods and herbal sources of resveratrol', *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(11), pp. 3337-3340.
- Bäckhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A. and Gordon, J. I. (2005) 'Host-bacterial mutualism in the human intestine', *science*, 307(5717), pp. 1915-1920.

- Cabreiro, F., Au, C., Leung, K.-Y., Vergara-Irigaray, N., Cochemé, H. M., Noori, T., Weinkove, D., Schuster, E., Greene, N. D. E. and Gems, D. (2013) 'Metformin retards aging in *C. elegans* by altering microbial folate and methionine metabolism', *Cell*, 153(1), pp. 228-239.
- Campos-Toimil, M., Elías, J., Álvarez, E., Verde, I. and Orallo, F. (2007) 'Effects of trans-and cis-resveratrol on Ca²⁺ handling in A7r5 vascular myocytes', *European journal of pharmacology*, 577(1), pp. 91-99.
- Cani, P. D., Neyrinck, A. M., Fava, F., Knauf, C., Burcelin, R. G., Tuohy, K. M., Gibson, G. R. and Delzenne, N. M. (2007) 'Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia', *Diabetologia*, 50(11), pp. 2374-2383.
- Cardona, F., Andrés-Lacueva, C., Tulipani, S., Tinahones, F. J. and Queipo-Ortuño, M. I. (2013) 'Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health', *The Journal of nutritional biochemistry*, 24(8), pp. 1415-1422.
- Cardwell, C. R., Stene, L. C., Joner, G., Cinek, O., Svensson, J., Goldacre, M. J., Parslow, R. C., Pozzilli, P., Brigis, G. and Stoyanov, D. 2008. Caesarean section is associated with an increased risk of childhood-onset type 1 diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies. *Springer*, pp. 726-735.
- Catalgol, B., Batirel, S., Taga, Y. and Ozer, N. K. (2012) 'Resveratrol: French paradox revisited', *Frontiers in pharmacology*, 3, pp. 141.
- Chao, J., Li, H., Cheng, K.-W., Yu, M.-S., Chang, R. C.-C. and Wang, M. (2010) 'Protective effects of pinostilbene, a resveratrol methylated derivative, against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells', *The Journal of nutritional biochemistry*, 21(6), pp. 482-489.
- Chen, W., Yeo, S. C. M., Elhennawy, M. G. A. A. and Lin, H.-S. (2016) 'Oxyresveratrol: A bioavailable dietary polyphenol', *Journal of Functional Foods*, 22, pp. 122-131.
- Chen, W., Yeo, S. C. M., Elhennawy, M. G. A. A., Xiang, X. and Lin, H.-S. (2015) 'Determination of naturally occurring resveratrol analog trans-4, 4'-dihydroxystilbene in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to a pharmacokinetic study', *Analytical and bioanalytical chemistry*, 407(19), pp. 5793-5801.
- Chen, X., He, H., Wang, G., Yang, B., Ren, W., Ma, L. and Yu, Q. (2007) 'Stereospecific determination of cis-and trans-resveratrol in rat plasma by HPLC: application to pharmacokinetic studies', *Biomedical chromatography*, 21(3), pp. 257-265.
- Chukwumah, Y., Walker, L., Vogler, B. and Verghese, M. (2012) 'Profiling of bioactive compounds in cultivars of Runner and Valencia peanut market-types using liquid chromatography/APCI mass spectrometry', *Food chemistry*, 132(1), pp. 525-531.
- Claesson, M. J., Jeffery, I. B., Conde, S., Power, S. E., O'Connor, E. M., Cusack, S., Harris, H. M. B., Coakley, M., Lakshminarayanan, B. and O'Sullivan, O. (2012) 'Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly', *Nature*, 492(7427), pp. 178.
- Colin, D., Gimazane, A., Lizard, G., Izard, J. C., Solary, E., Latruffe, N. and Delmas, D. (2009) 'Effects of resveratrol analogs on cell cycle progression, cell cycle associated proteins and 5fluoro-uracil sensitivity in human derived colon cancer cells', *International journal of cancer*, 124(12), pp. 2780-2788.
- Cottart, C. H., Nivet-Antoine, V., Laguillier-Morizot, C. and Beaudeau, J. L. (2010) 'Resveratrol bioavailability and toxicity in humans', *Molecular nutrition & food research*, 54(1), pp. 7-16.

- Das, S., Lin, H.-S., Ho, P. C. and Ng, K.-Y. (2008) 'The impact of aqueous solubility and dose on the pharmacokinetic profiles of resveratrol', *Pharmaceutical research*, 25(11), pp. 2593-2600.
- De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poullet, J. B., Massart, S., Collini, S., Pieraccini, G. and Lionetti, P. (2010) 'Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(33), pp. 14691-14696.
- de la Lastra, C. A. and Villegas, I. 2007. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Portland Press Limited*, pp. 1156-1160
- Delmas, D., Aires, V., Limagne, E., Dutartre, P., Mazué, F., Ghiringhelli, F. and Latruffe, N. (2011) 'Transport, stability, and biological activity of resveratrol', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1215(1), pp. 48-59.
- Desbonnet, L., Garrett, L., Clarke, G., Kiely, B., Cryan, J. F. and Dinan, T. G. (2010) 'Effects of the probiotic *Bifidobacterium infantis* in the maternal separation model of depression', *Neuroscience*, 170(4), pp. 1179-1188.
- Dolara, P., Luceri, C., De Filippo, C., Femia, A. P., Giovannelli, L., Caderni, G., Cecchini, C., Silvi, S., Orpianesi, C. and Cresci, A. (2005) 'Red wine polyphenols influence carcinogenesis, intestinal microflora, oxidative damage and gene expression profiles of colonic mucosa in F344 rats', *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 591(1), pp. 237-246.
- Drábiková, K., Perečko, T., Nosál, R., Harmatha, J., Šmidrkal, J. and Jančinová, V. (2012) 'Polyphenol derivatives—potential regulators of neutrophil activity', *Interdisciplinary toxicology*, 5(2), pp. 65-70.
- Elías Gómez, J. (2009) *Efectos de los isómeros del resveratrol sobre la homeostasis del calcio y del óxido nítrico en células vasculares*. Univ Santiago de Compostela.
- Etxeberria, U., Fernández-Quintela, A., Milagro, F. I., Aguirre, L., Martínez, J. A. and Portillo, M. P. (2013) 'Impact of polyphenols and polyphenol-rich dietary sources on gut microbiota composition', *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(40), pp. 9517-9533.
- Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y. and Yoshimura, K. (2011) 'Tobe, 577 T.; Clarke, JM; Topping, DL; Suzuki, T.; et al. Bifidobacteria can protect from 578 enteropathogenic infection through production of acetate', *Nature*, 469, pp. 543-579.
- Gakh, A. A., Anisimova, N. Y., Kiselevsky, M. V., Sadovnikov, S. V., Stankov, I. N., Yudin, M. V., Rufanov, K. A., Krasavin, M. Y. and Sosnov, A. V. (2010) 'Dihydro-resveratrol—a potent dietary polyphenol', *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 20(20), pp. 6149-6151.
- Gambini, J., Inglés, M., Olaso, G., Lopez-Grueso, R., Bonet-Costa, V., Gimeno-Mallench, L., Mas-Bargues, C., Abdelaziz, K. M., Gomez-Cabrera, M. C., Vina, J. and Borras, C. (2015) 'Properties of Resveratrol: In Vitro and In Vivo Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015.
- Gregersen, H. and Kassab, G. (1996) 'Biomechanics of the gastrointestinal tract', *Neurogastroenterology & Motility*, 8(4), pp. 277-297.
- Han, X., Shen, T. and Lou, H. (2007) 'Dietary polyphenols and their biological significance', *International Journal of Molecular Sciences*, 8(9), pp. 950-988.
- Hervert-Hernandez, D. and Goñi, I. (2011) 'Dietary polyphenols and human gut microbiota: a review', *Food Reviews International*, 27(2), pp. 154-169.

- Jandhyala, S. M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M. and Reddy, D. N. (2015) 'Role of the normal gut microbiota', *World journal of gastroenterology: WJG*, 21(29), pp. 8787.
- Jannin, B., Menzel, M., Berlot, J.-P., Delmas, D., Lançon, A. and Latruffe, N. (2004) 'Transport of resveratrol, a cancer chemopreventive agent, to cellular targets: plasmatic protein binding and cell uptake', *Biochemical pharmacology*, 68(6), pp. 1113-1118.
- Jeandet, P., Douillet-Breuil, A.-C., Bessis, R., Debord, S., Sbaghi, M. and Adrian, M. (2002) 'Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism', *Journal of Agricultural and food chemistry*, 50(10), pp. 2731-2741.
- Jeong, Y. J., An, C. H., Woo, S. G., Jeong, H. J., Kim, Y.-M., Park, S.-J., Yoon, B. D. and Kim, C. Y. (2014) 'Production of pinostilbene compounds by the expression of resveratrol O-methyltransferase genes in Escherichia coli', *Enzyme and microbial technology*, 54, pp. 8-14.
- Joint, F. A. O. (2002) 'WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food', *London, Ontario, Canada*, 30.
- Jung, C. M., Heinze, T. M., Schnackenberg, L. K., Mullis, L. B., Elkins, S. A., Elkins, C. A., Steele, R. S. and Sutherland, J. B. (2009) 'Interaction of dietary resveratrol with animal-associated bacteria', *FEMS microbiology letters*, 297(2), pp. 266-273.
- Kankainen, M., Paulin, L., Tynkkynen, S., von Ossowski, I., Reunanen, J., Partanen, P., Satokari, R., Vesterlund, S., Hendrickx, A. P. A. and Lebeer, S. (2009) 'Comparative genomic analysis of Lactobacillus rhamnosus GG reveals pili containing a human-mucus binding protein', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(40), pp. 17193-17198.
- King, R. E., Bomser, J. A. and Min, D. B. (2006) 'Bioactivity of resveratrol', *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5(3), pp. 65-70.
- King, R. E., Kent, K. D. and Bomser, J. A. (2005) 'Resveratrol reduces oxidation and proliferation of human retinal pigment epithelial cells via extracellular signal-regulated kinase inhibition', *Chemico-biological interactions*, 151(2), pp. 143-149.
- Kukreja, A., Wadhwa, N. and Tiwari, A. (2013) 'Therapeutic role of natural agents in beta-thalassemia: a review', *Journal of pharmacy research*, 6(9), pp. 954-959.
- Kukreja, A., Wadhwa, N. and Tiwari, A. (2014) 'Therapeutic role of resveratrol and piceatannol in disease prevention', *J Blood Disorders Transf*, 5(9), pp. 1.6.
- Lai, T. N. H., Herent, M.-F., Quetin-Leclercq, J., Nguyen, T. B. T., Rogez, H., Larondelle, Y. and André, C. M. (2013) 'Piceatannol, a potent bioactive stilbene, as major phenolic component in Rhodomyrtus tomentosa', *Food chemistry*, 138(2), pp. 1421-1430.
- Li, D., Wang, P., Wang, P., Hu, X. and Chen, F. (2016) 'The gut microbiota: a treasure for human health', *Biotechnology advances*, 34(7), pp. 1210-1224.
- Li, M., Sun, X., Zhou, Y., Wei, X., Sun, Y., Lan, X., Lei, C. and Chen, H. (2015) 'Nicotinamide and resveratrol regulate bovine adipogenesis through a SIRT1-dependent mechanism', *Journal of Functional Foods*, 18, pp. 492-500.
- Liao, D.-H., Zhao, J.-B. and Gregersen, H. (2009) 'Gastrointestinal tract modelling in health and disease', *World journal of gastroenterology: WJG*, 15(2), pp. 169.
- Liu, C. H., Lee, S. M., VanLare, J. M., Kasper, D. L. and Mazmanian, S. K. (2008) 'Regulation of surface architecture by symbiotic bacteria mediates host colonization', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(10), pp. 3951-3956.
- Lorenz, P., Roychowdhury, S., Engelmann, M., Wolf, G. and Horn, T. F. W. (2003) 'Oxyresveratrol and resveratrol are potent antioxidants and free radical scavengers:

- effect on nitrosative and oxidative stress derived from microglial cells', *Nitric Oxide*, 9(2), pp. 64-76.
- Lozupone, C. A., Stombaugh, J. I., Gordon, J. I., Jansson, J. K. and Knight, R. (2012) 'Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota', *Nature*, 489(7415), pp. 220-230.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C. and Jiménez, L. (2004) 'Polyphenols: food sources and bioavailability', *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), pp. 727-747.
- Marel, A. K., Lizard, G., Izard, J. C., Latruffe, N. and Delmas, D. (2008) 'Inhibitory effects of trans-resveratrol analogs molecules on the proliferation and the cell cycle progression of human colon tumoral cells', *Molecular nutrition & food research*, 52(5), pp. 538-548.
- Marier, J.-F., Vachon, P., Gritsas, A., Zhang, J., Moreau, J.-P. and Ducharme, M. P. (2002) 'Metabolism and disposition of resveratrol in rats: extent of absorption, glucuronidation, and enterohepatic recirculation evidenced by a linked-rat model', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 302(1), pp. 369-373.
- Ochoa-Repáraz, J., Mielcarz, D. W., Ditrio, L. E., Burroughs, A. R., Begum-Haque, S., Dasgupta, S., Kasper, D. L. and Kasper, L. H. (2010) 'Central nervous system demyelinating disease protection by the human commensal *Bacteroides fragilis* depends on polysaccharide A expression', *The Journal of Immunology*, 185(7), pp. 4101-4108.
- Orallo, F. (2006) 'Comparative studies of the antioxidant effects of cis- and trans-resveratrol', *Current medicinal chemistry*, 13(1), pp. 87-98.
- Patel, K. R., Andreadi, C., Britton, R. G., Horner-Glister, E., Karmokar, A., Sale, S., Brown, V. A., Brenner, D. E., Singh, R. and Steward, W. P. (2013) 'Sulfate metabolites provide an intracellular pool for resveratrol generation and induce autophagy with senescence', *Science translational medicine*, 5(205), pp. 205ra133-205ra133.
- Paulo, L., Oleastro, M., Gallardo, E., Queiroz, J. A. and Domingues, F. (2001) 'Antimicrobial properties of resveratrol: a review', *Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*, 2, pp. 1225-1235.
- Piotrowska, H., Kucinska, M. and Murias, M. (2012) 'Biological activity of piceatannol: leaving the shadow of resveratrol', *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 750(1), pp. 60-82.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F. and Yamada, T. (2010) 'A human gut microbial gene catalog established by metagenomic sequencing', *nature*, 464(7285), pp. 59.
- Rimando, A. M. and Suh, N. (2008) 'Biological/chemopreventive activity of stilbenes and their effect on colon cancer', *Planta medica*, 74(13), pp. 1635-1643.
- Scalbert, A., Morand, C., Manach, C. and Rémésy, C. (2002) 'Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health', *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56(6), pp. 276-282.
- Setoguchi, Y., Oritani, Y., Ito, R., Inagaki, H., Maruki-Uchida, H., Ichianagi, T. and Ito, T. (2014) 'Absorption and metabolism of piceatannol in rats', *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(12), pp. 2541-2548.
- Shanmuganathan, M. and Li, P. C. H. (2009) 'Resveratrol analysis and degradation study in blueberry samples by HPLC with fluorescence detection', *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*®, 32(20), pp. 3038-3048.
- Shin, N.-R., Whon, T. W. and Bae, J.-W. (2015) 'Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota', *Trends in biotechnology*, 33(9), pp. 496-503.

- Siemann, E. H. and Creasy, L. L. (1992) 'Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine', *American Journal of Enology and Viticulture*, 43(1), pp. 49-52.
- Signorelli, P. and Ghidoni, R. (2005) 'Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises', *The Journal of nutritional biochemistry*, 16(8), pp. 449-466.
- Slanina, J. and Taborska, E. (2004) 'Přijem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolu u člověka', *Chemické listy*, 98(5), pp. 239-245.
- Smoliga, J. M. and Blanchard, O. (2014) 'Enhancing the delivery of resveratrol in humans: if low bioavailability is the problem, what is the solution?', *Molecules*, 19(11), pp. 17154-17172.
- Spencer, J. P. E., El Mohsen, M. M. A., Minihane, A.-M. and Mathers, J. C. (2008) 'Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research', *British Journal of Nutrition*, 99(1), pp. 12-22.
- Stevens, J. F. and Maier, C. S. (2016) 'The chemistry of gut microbial metabolism of polyphenols', *Phytochemistry reviews*, 15(3), pp. 425-444.
- Takaki, M. (2003) 'Gut pacemaker cells: the interstitial cells of Cajal (ICC)', *Journal of Smooth Muscle Research*, 39(5), pp. 137-161.
- Tsao, R. (2010) 'Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols', *Nutrients*, 2(12), pp. 1231-1246.
- Tzounis, X., Vulevic, J., Kuhnle, G. G. C., George, T., Leonczak, J., Gibson, G. R., Kwik-Urbe, C. and Spencer, J. P. E. (2008) 'Flavanol monomer-induced changes to the human faecal microflora', *British Journal of Nutrition*, 99(4), pp. 782-792.
- Urpi-Sarda, M., Zamora-Ros, R., Lamuela-Raventos, R., Cherubini, A., Jauregui, O., De La Torre, R., Covas, M. I., Estruch, R., Jaeger, W. and Andres-Lacueva, C. (2007) 'HPLC–tandem mass spectrometric method to characterize resveratrol metabolism in humans', *Clinical chemistry*, 53(2), pp. 292-299.
- Urpí-Sardà, M., Jáuregui, O., Lamuela-Raventós, R. M., Jaeger, W., Miksits, M., Covas, M.-I. and Andres-Lacueva, C. (2005) 'Uptake of diet resveratrol into the human low-density lipoprotein. Identification and quantification of resveratrol metabolites by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry', *Analytical chemistry*, 77(10), pp. 3149-3155.
- Vitaglione, P., Sforza, S., Galaverna, G., Ghidini, C., Caporaso, N., Vescovi, P. P., Fogliano, V. and Marchelli, R. (2005) 'Bioavailability of trans-resveratrol from red wine in humans', *Molecular nutrition & food research*, 49(5), pp. 495-504.
- von Martels, J. Z. H., Sadabad, M. S., Bourgonje, A. R., Blokzijl, T., Dijkstra, G., Faber, K. N. and Harmsen, H. J. M. (2017) 'The role of gut microbiota in health and disease: in vitro modeling of host-microbe interactions at the aerobe-anaerobe interphase of the human gut', *Anaerobe*.
- Walle, T. (2011) 'Bioavailability of resveratrol', *Annals of the new York Academy of Sciences*, 1215(1), pp. 9-15.
- Walle, T., Hsieh, F., DeLegge, M. H., Oatis, J. E. and Walle, U. K. (2004) 'High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans', *Drug metabolism and disposition*, 32(12), pp. 1377-1382.
- Wallerath, T., Deckert, G., Ternes, T., Anderson, H., Li, H., Witte, K. and Förstermann, U. (2002) 'Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase', *Circulation*, 106(13), pp. 1652-1658.

- Walton, G. E., van den Heuvel, E. G. H. M., Kusters, M. H. W., Rastall, R. A., Tuohy, K. M. and Gibson, G. R. (2012) 'A randomised crossover study investigating the effects of galacto-oligosaccharides on the faecal microbiota in men and women over 50 years of age', *British Journal of Nutrition*, 107(10), pp. 1466-1475.
- Wenzel, E. and Somoza, V. (2005) 'Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol', *Molecular nutrition & food research*, 49(5), pp. 472-481.
- Williams, R. L., Elliott, M., Perry, R. and Greaves, B. (1996) 'The estrogenic activity of the polyphenolic resveratrol, benefits of moderate consumption of red wine', *Polyphenols Communications 96, Bordeaux France P*, 210, pp. 489-490.
- Wolter, F., Clausnitzer, A., Akoglu, B. and Stein, J. (2002) 'Piceatannol, a natural analog of resveratrol, inhibits progression through the S phase of the cell cycle in colorectal cancer cell lines', *The Journal of nutrition*, 132(2), pp. 298-302.
- Wu, G. D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y.-Y., Keilbaugh, S. A., Bewtra, M., Knights, D., Walters, W. A. and Knight, R. (2011) 'Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes', *Science*, 334(6052), pp. 105-108.
- Xiao, K., Zhang, H.-J., Xuan, L.-J., Zhang, J., Xu, Y.-M. and Bai, D.-L. (2008) 'Stilbenoids: chemistry and bioactivities', *Studies in natural products chemistry*, 34, pp. 453-646.
- Yang, J. Z., Jiang, H., Wang, W. J., Zhang, Y. M., Liu, Y. and Chen, Y. G. (2014) 'Isolation and Characterization of Batatasin III and 3, 4'-Dihydroxy-5-methoxybibenzyl: A Pair of Positional Isomers from *Sunipia scariosa*', *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(4), pp. 533-535.
- Yatsunenkov, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R. N. and Anokhin, A. P. (2012) 'Human gut microbiome viewed across age and geography', *nature*, 486(7402), pp. 222.
- Yeo, S. C. M., Ho, P. C. and Lin, H. S. (2013) 'Pharmacokinetics of pterostilbene in Sprague-Dawley rats: The impacts of aqueous solubility, fasting, dose escalation, and dosing route on bioavailability', *Molecular nutrition & food research*, 57(6), pp. 1015-1025.
- Zhang, H. and Tsao, R. (2016) 'Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects', *Current Opinion in Food Science*, 8(Supplement C), pp. 33-42.
- Zhao, L. (2013) 'The gut microbiota and obesity: from correlation to causality', *Nature Reviews. Microbiology*, 11(9), pp. 639.
- ČR, M. Z. (2014) 'Zpráva o zdraví obyvatel České republiky', *Dostupné zde: http://www.szu.cz/uploads/documents/czsp/aktuality/Cesi_ziji_dele_ale_trapi_je_civilizacni_nemoci/Zprava_o_zdravi_obyvatel_CR_.pdf*.
- Šmidrkal, J. (2004) 'Resveratrol'.
- Šmidrkal, J., Filip, V., Melzoch, K., Hanzlíková, I., Buckiová, D. and Křísa, B. (2001) 'Resveratrol', *Chemické listy*, 95, pp. 602-609.

8 Seznam zkratek

AMPK – protein aktivovaná kináza

BLA – blank

CoA – koenzym A

COX – cyklooxygenáza

CYP1B1 – cytochrom P450 1B1

FOS – fruktooligocharidy

GOS – galaktooligosacharidy

GLUT4 – transportér aktivující glukózu

HRMS – hmotnostní detektor s vysokým rozlišením

IC50 – maximální inhibiční koncentrace

LC-MS – kapalinová chromatografie s hmotnostním detektorem

LDL – lipoproteiny s nízkou hustotou

MRM – multiple reaction monitoring

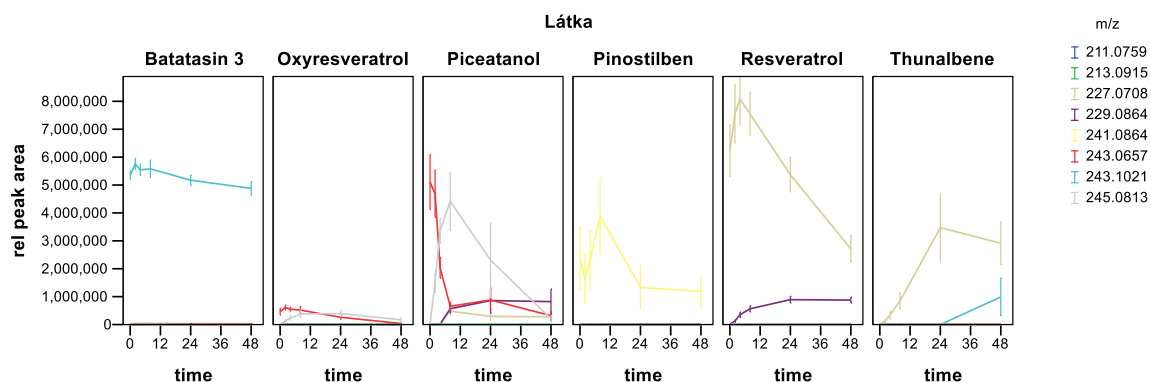
MS Q-TOF – hmotnostní spektrometr s time of flight hmotnostním detektorem

SOD – superoxiddismutáza

SPE – solid phase extraction

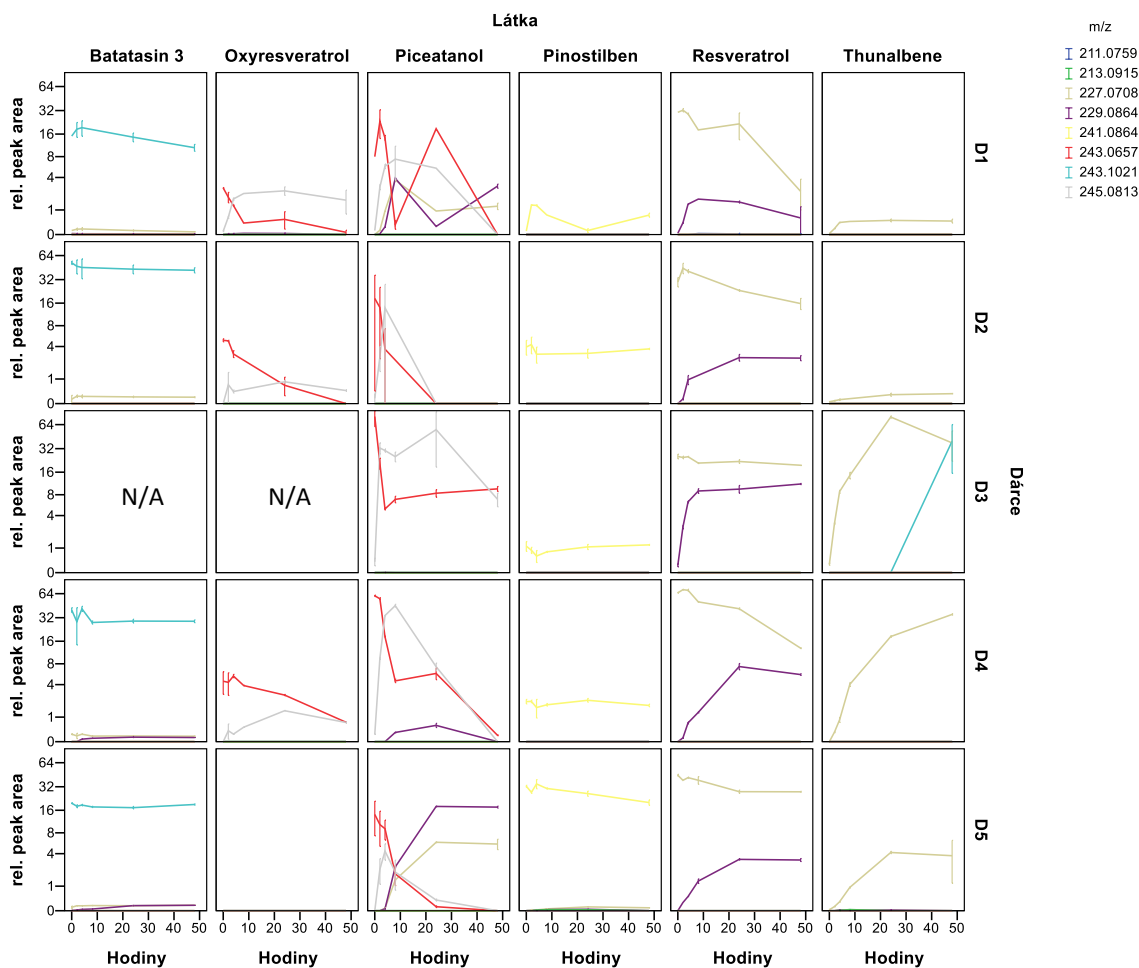
UHPLC – ultra high pressure kapalinový chromatograf

Přílohy



m/z	Stilbenoid
211.0759	Pinosylvin
213.0915	Dihydro-3,5-dihydroxystilben
227.0708	Resveratrol
229.0864	Dihydroresveratrol/Dihydro-3,5,3'-trihydroxystilben
241.0864	Pinostilben
243.0657	Oxyresveratrol/Piceatanol
243.1021	Batatasin III
245.0813	Dihydrooxyresveratrol/Dihydropiceatannol

Obrázek 17: Fermentační profily stilbenoidů ve statických inkubacích zaočkovaných lidskou stolicí vyjádřené plochou píků v poměru k vnitřnímu standardu (n=5), vertikální úsečka SEM (střední chyba průměru)



m/z	Stilbenoid
211.0759	Pinosylvin
213.0915	Dihydro-3,5-dihydroxystilben
227.0708	Resveratrol
229.0864	Dihydroresveratrol/Dihydro-3,5,3'-trihydroxystilben
241.0864	Pinostilben
243.0657	Oxyresveratrol/Piceatanol
243.1021	Batatasin III
245.0813	Dihydrooxyresveratrol/Dihydro-piceatannol

Obrázek 18: Interindividuální rozdíly vyjádřené plochou píků jednotlivých stilbenoidů v poměru k vnitřnímu standardu (n=5), vertikální úsečka SEM (střední chyba průměru), N/A – nebylo analyzováno