

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality a bezpečnosti potravin



Metabolismus resveratrolu v modelu tlustého střeva

Bakalářská práce

Autor práce: Lucie Nová

Obor studia: Kvalita produkce

Vedoucí práce: Ing. Veronika Jarošová

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Metabolismus resveratrolu v modelu tlustého střeva" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské 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 bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14.7.2020

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala především Ing. Veronice Jarošové za její rady, čas, pomoc při práci v laboratoři a velmi přátelský přístup během vedení mé bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala pracovníkům z Katedry kvality a bezpečnosti potravin, kteří byli vždy ochotni pomoci s jakýmkoliv problémem a vytvořili příjemnou atmosféru na pracovišti. Nakonec patří obrovské poděkování mé rodině, ale i přátelům, kteří mě po celý čas studia psychicky podporovali a dodávali odvahu.

Metabolismus resveratrolu v modelu tlustého střeva

Souhrn

Resveratrol je základní a zatím nejvíce zkoumaná sloučenina ze skupiny stilbenoidů. Resveratrolu i ostatním stilbenoidům je připisováno mnoho pozitivních vlastností, kterými jsou schopny působit na zdraví člověka. Resveratrol vykazuje schopnost rychlého vstřebávání a metabolismu v lidském organismu, čímž vznikají metabolity s rozdílnou chemickou strukturou. V posledních letech vzrostl zájem zejména ve zkoumání mikrobiálních metabolitů resveratrolu.

Praktická část této práce byla zaměřena na zkoumání vzniku metabolitů resveratrolu pomocí bakterií, které byly přítomny ve vzorcích stolice. *In vitro* fermentace probíhala v 96-jamkových deep-well destičkách, ze kterých byly následně v pěti časových bodech (0,2,4,8 a 24 hodin) odebírány vzorky pro měření. Vzorky byly podrobeny NMR analýze, při které byla změřena spektra a koncentrace vzniklých metabolitů. Nakonec byly výsledky z NMR spektrometru statisticky zanalyzovány. Cílem praktické části bakalářské práce bylo stanovit hlavní katabolity resveratrolu a posoudit funkčnost nové fermentační metody.

Z výsledků této práce bylo zjištěno, že chemická struktura resveratrolu prošla mikrobiální přeměnou. Hlavním a zároveň jediným metabolitem, který během fermentace vznikl, byl dihydroresveratrol. Ve vzorcích byl hledán i lunularin, který byl dříve také identifikován jako metabolit resveratrolu. Důvodem, proč byla nalezena pouze jedna nově vzniklá sloučenina, je pravděpodobně rozdílné složení střevní mikrobioty našich dárců. Fermentace v 96-jamkových deep-well destičkách byla vyhodnocena jako funkční a vyhovující pro další experimenty.

Klíčová slova: gastrointestinální trakt člověka, mikrobiota, resveratrol, katabolismus, NMR

Metabolism of resveratrol in the colon model

Summary

Resveratrol is the essential and most studied compound of the stilbenoid group. Resveratrol, as well as other stilbenoids, is attributed to many positive properties that are able to affect human health. Resveratrol has the ability to be rapidly absorbed and metabolized in the human body, thereby producing metabolites with different chemical structures. In recent years, there has been a growing interest in the study of microbial metabolites of resveratrol.

The practical part of this thesis was focused on the formation of resveratrol metabolites using bacteria derived from stool samples. *In vitro* fermentation took place in 96-deep well plates, from which the samples for measurement were taken in five time points (0, 2, 4, 8, and 24 hours). The samples were subjected to NMR analysis and the spectrum and concentration of produced metabolites were measured. Finally, the results from NMR spectrometer were statistically analysed. The aim of the practical part of this bachelor thesis was to determine the main catabolites of resveratrol and to assess the functionality of the new fermentation method.

The results of this thesis show that the chemical structure of resveratrol went through microbial transformation. The main and only metabolite, that arose during fermentation was dihydroresveratrol. Lunularin, another known metabolite of resveratrol, was also searched. The reason why the only one newly formed compound was found is probably in the different composition of the gut microbiota of our donors. Fermentation in 96-deep well plates was evaluated as functional and suitable for further experiments.

Keywords: human gastrointestinal tract, microbiota, resveratrol, catabolism, NMR

Obsah

1	Úvod.....	7
2	Cíl práce	8
3	Literární rešerše	9
3.1	Trávicí soustava člověka	9
3.2	Mikrobiom trávicího traktu.....	10
3.2.1	Mikrobiom dutiny ústní.....	11
3.2.2	Mikrobiom žaludku	11
3.2.3	Střevní mikrobiom.....	12
3.3	Patogeny trávicího traktu	13
3.4	Polyfenoly	14
3.4.1	Flavonoidy.....	15
3.4.2	Stilbenoidy.....	18
3.5	Vliv polyfenolů na mikrobiom.....	22
3.6	Metabolismus stilbenoidů	23
3.7	Vliv stilbenoidů na zdraví člověka	25
3.8	<i>In vitro</i> modely trávicí soustavy.....	27
4	Materiál a metodika	31
4.1	<i>In vitro</i> fekální fermentační systém	31
4.1.1	Chemikálie.....	31
4.1.2	Fermentační médium	31
4.1.3	Příprava 96-jamkových deep-well destiček	31
4.1.4	Fosfátový pufr, redukční roztok	31
4.1.5	Příprava vzorků stolice	32
4.1.6	Příprava roztoku resveratrolu	32
4.1.7	Proces fermentace.....	32
4.1.8	Příprava vzorku pro NMR analýzu	32
4.1.9	NMR analýza.....	32
4.1.10	Statistická analýza	33
5	Výsledky	34
6	Diskuze	36
7	Závěr.....	39
8	Literatura	40
9	Seznam obrázků	I
10	Seznam použitých zkratk a symbolů	II

1 Úvod

Resveratrol je chemická látka patřící do skupiny stilbenů, jenž se řadí mezi větší skupinu, která se nazývá polyfenoly. Stilbenoidy vykazují řadu člověku prospěšných vlastností a mezi nejvýznamnější patří antioxidační, neuroprotektivní a protizánětlivá aktivita. Stilbeny jsou běžnou součástí některých rostlin, ve kterých přirozeně vznikají skrze fenylpropanoidovou dráhu. Resveratrol se nejvíce vyskytuje v křídlatce japonské (*Polygonum cuspidatum*), révě vinné (*Vitis vinifera*), ale také v rostlinných plodech (arašídy).

Zvýšený zájem o resveratrol vypukl již v devadesátých letech, v souvislosti s tzv. francouzským paradoxem, kdy u obyvatel jižní Francie byl zjištěn nižší výskyt kardiovaskulárních chorob i úmrtnost ve srovnání se Spojenými státy americkými, navzdory rizikovým faktorům jako je konzumace potravin bohatých na nasycené mastné kyseliny. Možným vysvětlením by mohla být mírná a pravidelná konzumace červeného vína, které obsahuje vysoké koncentrace výše zmíněného resveratrolu.

V následujících letech, byl resveratrol podroben jak *in vitro*, tak *in vivo* výzkumům, ve kterých bylo zjištěno mnoho pozitivních účinků resveratrolu na zdraví člověka (antioxidační, antiaterogenní, protinádorové a další) a působení na střevní mikrobiotu.

Přirozený mikrobiom je ve všech částech trávicího traktu velice rozmanitý a podílí se na správné funkci lidského organismu. Mikrobiota přítomná ve střevech se z velké části podílí na metabolismu resveratrolu v lidském i zvířecím těle, čímž ovlivňuje vznik jednotlivých metabolitů. V posledních letech vzrostl počet *in vitro* a *in vivo* studií, zaměřených na metabolismus stilbenoidů, zejména *trans*-resveratrolu. I přes zvýšený zájem zjistit, jak transformace resveratrolu probíhá, jakým způsobem ji ovlivňuje střevní mikrobiota a jaké metabolity vznikají, stále není dostatečné množství výzkumů a z tohoto důvodu nejsou veškeré procesy zcela objasněny. Avšak jisté je to, že resveratrol je střevními bakteriemi rozkládán a v doposud provedených výzkumech byly nalezeny tři metabolity: dihydroresveratrol, 3,4'-dihydroxybibenzyl (lunularin) a *trans*-3,4'-dihydroxystilben. Z těchto 3 látek se nejčastěji jako hlavní metabolit uvádí dihydroresveratrol.

Lepší znalost osudu resveratrolu v trávicím traktu, by mohla napomoci k jeho častějšímu a vhodnějšímu využití pro léčebné účely, zejména k prevenci některých chronických (kardiovaskulární choroby, neurodegenerativní onemocnění, rakovina a další) i neurodegenerativních onemocnění (Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba a Huntingtonova choroba).

K získání nových poznatků a prohloubení dosavadních znalostí, se nejčastěji využívají *in vitro* modely, které jsou schopny napodobit fyziologické procesy lidského organismu. *In vitro* modelů existuje celá řada a často nahrazují nebo doplňují *in vivo* výzkumy na zvířatech či lidech.

Tato práce se zabývá studiem metabolismu resveratrolu a vznikem metabolitů v modelu tlustého střeva. K výzkumu byly nově použity 96-jamkové deep-well destičky, u kterých se zkoušela jejich účinnost a byly porovnány s jinými metodami fermentace.

2 Cíl práce

Cílem teoretické části bakalářské práce bylo zpracování literární rešerše, zaměřené na mikrobiotu a osud fenolových sloučenin v trávicím traktu člověka. Cílem praktické části bylo stanovit hlavní katabolity resveratrolu a posoudit funkčnost nové metody fermentace v 96-jamkových deep-well destičkách.

Hypotéza: Resveratrol bude mikrobiálně transformován mikrobiotou tlustého střeva na nové metabolity

3 Literární rešerše

3.1 Trávicí soustava člověka

Trávicí soustava je svalnatá trubice o délce až 9 metrů. Horní část se skládá z dutiny ústní, jícnu, žaludku a tenkého střeva. Spodní pasáž je složena z tlustého střeva, konečníku a řitního otvoru (Greenwood-Van Meerveld et al. 2017). Stěna trubice má čtyři základní histologické vrstvy: serózu, svalovinu (muscularis externa), submukózu a mukózu (Ashford 2017). Mukóza má u všech orgánů trávicího traktu zcela odlišnou buněčnou strukturu, zatímco ostatní vrstvy mají podobnou stavbu napříč celou soustavou (Wood & Montgomery 2014).

Trávicí soustava začíná dutinou ústní, kde dochází k příjmu a prvnímu zpracování potravy. Skládá se z několika částí, mezi které patří rty, tváře, jazyk, slinné žlázy a zuby (Peate & Nair 2015). Mechanické zpracování potravy probíhá díky zubům a pohybu jazyka. Naopak chemické zpracování je zajištěno produkcí slin ze slinných žláz. Sliny obsahují amylasu, což je enzym, který štěpí škrob na jednotky glukosy. Nepostradatelnou součástí jsou i elektrolyty a hleny, které napomáhají zneutralizovat a zvlhčit potravu (Brooks 2006). Připravené sousto je následně spolknuto a pokračuje hltanem do jícnu (Mohn & Johnson 2015).

Hltan zajišťuje spojení mezi dutinou ústní a jícnem, ale také mezi dutinou nosní a hrtanem. Hltan je složen ze tří oddílů, nosohlтанu, ústní části a hrtanové části (Rehfeld et al. 2017). Součástí nosohlтанu je Eustachova trubice vedoucí do sluchového ústrojí. Podél bočních stěn ústní části hltanu se rozkládají párové mandle (Hodler et al. 2016). Sousto, které se z úst přemístilo do hltanu, spustí polykací reflex. Tento reflex zabraňuje vniknutí potravy do plic a zajišťuje její správné nasměrování do jícnu (Brooks 2006)

Jícen je 25 cm dlouhá trubice. Tělo má složené z krčních a hrudních segmentů. Parasympatickou inervaci mu poskytuje bloudivý nerv, zatímco o sympatickou inervaci se starají krční a paravertebrální ganglia (Wood & Montgomery 2014). Hlavní funkcí jícnu je přemístit sousto z úst do žaludku. Při tomto procesu je důležitý hlen vylučovaný mukózou, který napomáhá snadnému průchodu sousta, ale také chrání jícen proti odření a podráždění (Peate & Nair 2015). Potrava se jícnem pohybuje pomocí peristaltických stahů, které ji dopraví do žaludku během 10-14 sekund (Ashford 2017).

Žaludek je svalnatý orgán ležící v levé horní části dutiny břišní (Peate & Nair 2015). Skládá se z česla, klenby, těla a vrátníku. Česlo i vrátník mají podobnou histologickou strukturu, která jim napomáhá k ochraně jícnu a dvanáctníku od kyselin a enzymů přítomných v žaludku (Wood & Montgomery 2014). Zásadní funkcí tohoto orgánu je dočasné uskladnění přijaté potravy a její přeměna na chymus neboli tráveninu (Ashford 2017). Žaludek produkuje denně přibližně 2 litry žaludečních šťáv, které se skládají z kyseliny chlorovodíkové, gastrinu, pepsinogenu a hlenu. Kyselina chlorovodíková snižuje okolní pH a tím aktivuje pepsinogen na pepsin, ale také zamezuje přežití nežádoucích mikroorganismů. Pepsin je enzym, který zajišťuje hydrolyzu proteinů na peptidy. Gastrin je hormon řídící produkci žaludečních kyselin a pepsinogenu. Samotné uvolnění hormonu je závislé na množství aminokyselin, peptidů, ale také na rozpětí žaludku. Vzniklý chymus opouští žaludek a vstupuje do tenkého střeva (Brooks 2006).

Tenké střevo tvoří nejdelsí část celé trávicí soustavy, může měřit až 6 m (Rehfeld et al. 2017). Zodpovídá za vstřebávání živin a vody, udržuje elektrolytickou rovnováhu, podílí se

na endokrinním vylučování a tvoří imunitní bariéru. Největší podíl na absorpci živin mají slizniční klky, které pokrývají celý povrch střeva. V ose klků jsou přítomny mízní vlasečnice, jež umožňují vstřebávání chylomikronů a vitaminů rozpustných v tucích. Další důležitou roli zastávají mikrokilky na apikální straně enterocytů, kde vytvářejí tzv. kartáčový lem, který obsahuje enzymy pro rozštěpení proteinů, sacharidů a nukleosidů (Campbell et al. 2019).

Začátek tenkého střeva se nazývá dvanáctník. Dvanáctník je spojen se slinivkou břišní, játry a žlučníkem. (Peate & Nair 2015). V játrech se vytváří žluč, podporující rozklad tuků, která je složená z organických a anorganických látek. Nevyužitá žluč se ukládá v žlučníku (Ashford 2017). Slinivka břišní dodává do tenkého střeva trávicí enzymy (trypsin, chymotrypsin, amylázu, lipázu) a hydrogenuhličitan, který neutralizuje chymus z žaludku. Vylučování šťáv do dvanáctníku je řízeno sekretinem a cholecystokininem. Množství uvolněných hormonů závisí na kyselosti a obsahu tuku v trávenině (Mohn & Johnson 2015).

Následující část tenkého střeva tvoří lačník. Oproti dvanáctníku je větší, více cévnatý a má silnější stěny. Lačník má mnoho cirkulárních slizničních řas, jež zvětšují absorpční plochu střeva (Peate & Nair 2015).

Poslední oddíl tenkého střeva se nazývá kyčelník, měří přibližně 3,5 m (Rehfeld et al. 2017). Nachází se zde velké množství Peyeroých plátů, lymfoidní tkáň, která je součástí imunitního systému (Wood & Montgomery 2014). Konec kyčelníku plynule přechází do tlustého střeva (Rehfeld et al. 2017).

Tlusté střevo je rozděleno na slepé střevo s červovitým výběžkem, tračník (vzestupný, příčný a sestupný), sigmoidní kličku, konečník a řitní otvor (Chen et al. 2015). Celková délka je přibližně 1,2 m a jeho průměr se pohybuje mezi 6–9 cm. Každý den je do tlustého střeva uvolněno 1,5 l tráveniny. Přijatá trávenina je v tlustém střevě asi 20 hodin a po průchodu celým střevem je zredukována na 150 g (100 ml vody a 50 g pevných látek) (Ward & Linde 2017). Funkcí tlustého střeva je vstřebat sodné ionty, chloridové ionty a vodu z lumenu střeva (Wood & Montgomery 2014). Proces vstřebávání je řízen $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPázami, které jsou umístěny v bazolaterálních a laterálních membránách epitelálních buněk střevní sliznice (Ward & Linde 2017). Sliznice tlustého střeva nese žádné klky ke vstřebávání látek, jak tomu je u tenkého střeva. Na povrchu sliznice jsou krypty, které převážně obsahují pohárkové buňky, ale také absorpční buňky (Wood & Montgomery 2014). Nelze však vynechat druhou důležitou úlohu, kterou tlusté střevo zajišťuje a tou je uskladnění fekálního materiálu (Ashford 2017).

3.2 Mikrobiom trávicího traktu

Mikrobiom v trávicím traktu člověka je velice bohatý a rozmanitý. Vytváří ekosystém složený z obrovského počtu bakterií, archeí, hub a virů. V lidském střevě se nachází zhruba 1000 druhů bakterií, 5 rodů archeí, 66 rodů hub a nespočet virů (převážně bakteriofágů) (Kverka & Tlaskalová-Hogenová 2017). Nejpočetnějšími kmeny bakterií jsou Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Verrucomicrobia a Proteobacteria (Hoyle & Swann 2019). Mikrobiální složení se u každého jedince liší a je ovlivňováno věkem, stravou a případným užíváním antibiotik (Kverka & Tlaskalová-Hogenová 2017).

Z mnohých studií vyplývá, že mikrobiota se podílí na metabolismu chemických látek z potravy a má vliv na zdraví člověka. K těmto výzkumům se využívají modely *in vitro* nebo *in vivo* na zvířatech. Hlavním důvodem, proč tyto studie probíhají, je získat nové poznatky,

kteřé by mohly pomoci s léčbou gastrointestinálních nemocí (Crohnova nemoc, syndrom dráždivého tračníku, rakovina střev a další) (Rowland et al. 2018).

3.2.1 Mikrobiom dutiny ústní

Henderson a Nibali (2016) uvádí, že dutina ústní je nejvíce osídlenou částí těla hned po tlustém střevě. Mikroorganismy, které se zde vyskytují, jsou velmi důležité, protože dokáží zabránit kolonizaci patogeny. Přítomné bakterie umí redukovat dusičnany na dusitany, jež jsou dále přeměněny na oxid dusnatý. Oxid dusnatý snižuje riziko vzniku aterosklerózy (Cosby et al. 2003) a přijímání potravy s vysokým obsahem nitrátu snižuje krevní tlak (Kapil et al. 2010).

Nezbytnou součástí dutiny ústní jsou sliny, jež obsahují jak látky proti nechtěnému přemnožení mikroorganismů (laktoferrin, laktoperoxidáza, lyzozym, statherin, histatiny), tak glykoproteiny, které jsou pro mikroorganismy důležité jako zdroj uhlohydrátů (Van’T Hof et al. 2014). V 1 ml slin je až 100 milionů mikroorganismů (Kilian et al. 2016).

Archea se v ústech podílejí na tvorbě metanu. Metan vytváří z produktů proteolytických anaerobů (mastné kyseliny s krátkým řetězcem, oxid uhličitý a vodík), které následně přemění. Nejvíce vyskytující se archea v dutině ústní je *Methanobrevibacter oralis*, *Methanobrevibacter smithii* a *Methanosarcina* spp. (Henderson & Nibali b.r.).

He et al. (2015) zmiňují další nezanedbatelnou součást ústního mikrobiomu, houby. Bylo zjištěno, že lidská ústa osídluje 9–23 druhů hub. Nejhojnější zastoupení má rod *Candida* spp., z kterého se zde nachází hned několik druhů (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida stellatoidea*, *Candida kefyr* a *Candida dubliniensis*). Orální mikrobiom zahrnuje i rody *Cladosporium* spp., *Aureobasidium* spp., *Saccharomyces* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. a *Cryptococcus* spp. Zajímavé je, že *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. a *Cryptococcus* spp. jsou patogenní houby, ale v dutině ústní jsou považovány za zdraví prospěšné (Xu & Dongari-Bagtzoglou 2015).

Ahn et al. (2011) identifikovali 5 základních kmenů bakterií dutiny ústní (Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, a Fusobacteria) pomocí 16S rRNA sekvenační analýzy. Ze zmíněných kmenů byly dále vybrány nejčastěji se vyskytující rody (*Streptococcus* spp., *Veillonella* spp., *Leptotrichia* spp., *Prevotella* spp., a *Haemophilus* spp.). Orální bakterie mezi sebou komunikují a vytvářejí faktory, které ovlivňují jejich růst a vývoj. Dokáží spolupracovat na rozkladu glykoproteinů ze slin, čímž napomáhají získat výživu pro celou bakteriální komunitu (Kerr 2015).

3.2.2 Mikrobiom žaludku

Prostředí žaludku má velmi kyselý charakter (pH = 1–2) (Rehfeld et al. 2017). Výskyt mikroorganismů je zde minimální, přesto se v žaludku vyskytují některé druhy. Dominantní bakterií je *Helicobacter pylori* se schopností přežít kyselé podmínky. K tomuto účelu jí slouží enzym ureáza, která rozkládá močovinu na amoniak a tím udržuje správné pH k přežití. Bylo však zjištěno, že *H.pylori* obsahuje chemoreceptory detekující kyselinu chlorovodíkovou a nejspíš dokáží bakterii navést do žaludečního epitelu, kde je pH téměř neutrální (Huang et al. 2017).

Jandhyala et al. (2015) uvádí, že zastoupení jiných mikroorganismů v žaludku závisí na tom, jestli je *H.pylori* přítomná jako komenzál nebo jako patogen. Nejhojnější výskyt má *Streptococcus* spp., *Prevotella* spp., *Veillonella* spp. a *Rothia* spp.

3.2.3 Střevní mikrobiom

Střevní mikrobiom je důležitý ke správnému fungování lidského organismu. K nejvýznamnějším rolím patří udržování neporušenosti slizniční bariéry, poskytování živin (např. vitaminy), ochrana těla proti patogenům a napomáhání k řádné funkci imunitního systému (Thursby & Juge 2017). Množství bakterií v gastrointestinálním traktu roste distálním směrem. Na začátku tenkého střeva se počet pohybuje okolo 10^3 KTJ/g a v tlustém střevě dosahuje až 10^{12} KTJ/g (Minalyan et al. 2017).

Tenké střevo má malou hustotu mikroorganismů především kvůli tomu, že zde ústí vývod s žlučovými kyselinami, které zabraňují jejich rozvoji (Tuohy & Scott 2014). V první části tenkého střeva jsou přítomni grampozitivní aerobové, zatímco na konci tenkého střeva se vyskytují pouze grampozitivní anaerobové a fakultativní anaerobové (Minalyan et al. 2017). Aidy et al. (2015) zmiňují rody *Clostridium* spp., *Escherichia* spp. a *Turicibacter* spp., které se v tenkém střevě objevují v proměnném množství. *Streptococcus* spp. a *Veillonella* spp. jsou uváděny za nejhojněji vyskytující se rody.

Tlusté střevo obsahuje velmi bohatou mikrobiotu (Mohn & Johnson 2015). Tlusté střevo zdravého dospělého člověka obsahuje stovky různých druhů bakterií, zejména z kmene Bacteroidetes, Firmicutes a Proteobacteria (Ishiguro et al. 2018). Bakterie přítomné v tračníku produkují enzymy, které rozkládají vlákninu, škrob a nesacharidový materiál. Mezi nejvíce známé bakterie štěpící polysacharidy patří *Bacteroides* spp. (škrob, celulóza), *Bifidobacterium* spp. (fruktooligosacharidy, inulin, škrob), *Clostridium* spp. (celulóza), *Enterococcus* spp. (celulóza), *Roseburia* spp. (inulin, škrob) a *Ruminococcus* spp. (škrob, celulóza, xylan) (Hoyle & Swann 2019). Degradace polysacharidů během fermentačního procesu mění střevní pH. Na začátku slepého střeva se pH pohybuje okolo 6, ale distálním směrem pomalu vzrůstá až na 7,5 (Ashford 2017). Při této metabolické reakci vznikají mastné kyseliny s krátkým řetězcem, 95 % z nich je využito jako zdroj energie pro střevní buňky a zbytek je vyloučen (Ishiguro et al. 2018). Butyrát, propionát a acetát se považují za hlavní látky, uvolňované při tomto procesu. Butyrát je zdrojem energie pro kolonocyty a podílí se na aktivaci střevní glukoneogeneze (Valdes et al. 2018). Butyrát vyvolává apoptózu kolorektálních nádorových buněk prostřednictvím hyperacetylace histonů (H3 a H4), což vede k tomu, že DNA je v otevřenější formě (Wong et al. 2006). Propionát je odváděn do jater, kde řídí průběh glukoneogeneze a acetát, jenž je esenciálním metabolitem pro růst bakterií, se podílí na metabolismu cholesterolu a lipogenezi v periferních tkáních (Valdes et al. 2018). Střevní mikrobiota je dále schopna produkovat vitaminy (thiamin, riboflavin, niacin, biotin, kyselina pantothenová, kyselina listová, vitamin K) a sekundární žlučové soli. Zmíněné soli mohou být vstřebány v tračníku nebo vyloučeny se stolicí (Ishiguro et al. 2018). Metabolická aktivita a celkové složení mikrobioty závisí na pH prostředí. Vzestupný tračník má kyselý charakter, ale distálním směrem pH pomalu vzrůstá (Tuohy & Scott 2014).

3.3 Patogeny trávicího traktu

Patogeny jsou organismy, které jsou schopné se v hostiteli usadit, replikovat se a současně poškozovat okolní buněčné prostředí. Patogeny se lze nakazit například od zvířete, z půdy, vody, rostlinného materiálu, potravin, ale také od člověka. Potravinu se mohou kontaminovat již při pěstování na farmách, procesu zpracování, skladování i během transportu. Všechny patogenní organismy sdílejí podobné cíle, kterých chtějí dosáhnout: vstoupit a přežít uvnitř hostitele, najít správný prostor pro přežití, vyhnout se obranným mechanismům hostitele, replikovat se, přenášet se na další hostitele a být schopný se projevit v hostiteli. Pro přežití patogenů jsou důležité i vnější faktory jako je obsah kyslíku, oxidu uhličitého, žlučových solí, živin, hodnota pH, složení ostatních mikroorganismů a další (Bhunia 2018).

Clostridium difficile je grampozitivní, obligátně anaerobní sporulující bakterie. Produkuje toxin A (TcdA, toxin clostridium difficile A), toxin B (TcdB, toxin clostridium difficile B) a binární toxin (CDT, *C. difficile* toxin). TcdA narušuje střevní epitel a napomáhá průchodu TcdB, který způsobuje nežádoucí změny uvnitř buněk (Bhunia 2018). Infekce je přenášena spory, protože narozdíl od vegetativních (metabolicky aktivních) buněk jsou vysoce odolné vůči podmínkám okolního prostředí. Spory přežijí kyselá žaludeční šťávy, dostanou se do dvanáctníku, kde klíčí a následně zrají. Vzniklé vegetativní buňky se šíří do tlustého střeva, produkují zmíněné toxiny a sporulují (Smits et al. 2016).

Bhunia (2018) uvádí, že klinické příznaky a závažnost onemocnění, které *C. difficile* způsobuje, se u pacientů může lišit. Mezi nemoci zapříčiněné *C. difficile* patří kolitida, pseudomembranózní kolitida a fulminantní kolitida.

Zástupci rodu *Salmonella* spp. jsou gramnegativní, fakultativně anaerobní nesporotvorné tyčinky z čeledi Enterobacteriaceae. Bakterie dokáží růst při 5–45 °C, ale optimální teplota se pohybuje mezi 35–37 °C. Vhodné rozmezí pH, ve kterém se *Salmonella* spp. dokáže vyvíjet je 6–7, může však přežít i v kyselějších podmínkách (Bhunia 2018).

Tyto bakterie způsobují salmonelózy u lidí, které se projevují buď jako enterické horečky nebo jako gastroenteritidy. Termín enterická horečka se používá pro břišní tyfus a paratyfus. *S. typhi* způsobuje břišní tyfus, zatímco paratyfus je zapříčiněn *S. paratyphi*. Člověk se může nakazit vodou a potravinami, které jsou kontaminované odpadem infikovaných jedinců. Enterická horečka se projevuje průjmami, horečkou, bolestí břicha a hlavy (Eng et al. 2015). Příznaky u gastroenteritidy jsou podobné, ale jsou způsobeny *S. enteritidis* a *S. typhimurium* (Bhunia 2018).

Listeria spp. zahrnuje grampozitivní, tyčinkovité nesporulující bakterie. V závislosti na okolních podmínkách, mohou vytvářet dlouhé řetězovité útvary. Zástupci jsou velice odolní a jsou schopni přežít extrémní podmínky včetně širokého rozsahu pH (4,1–9,6), vysokého obsahu solí (10 % a více) a přítomnosti antimikrobiálních látek. Patří mezi psychrofilní organismy, tím pádem dokáží přežít i velmi nízké teploty (1–45 °C). Rod *Listeria* spp. zahrnuje 17 druhů, ale na člověka působí patogenně pouze *L. monocytogenes*. *L. monocytogenes* způsobuje listeriózu, která je velmi nebezpečná hlavně pro novorozence, osoby starší 60 let, těhotné ženy i lidi se sníženou imunitou. *L. monocytogenes* vyvolává 2 fáze onemocnění: intestinální a systémovou. Při intestinální fázi dochází k bakteriální kolonizaci střeva a k průniku střevní bariérou do krevního řečiště nebo lymfatického systému. Během systémové fáze se bakterie dostávají do jater (90 %), sleziny (10 %), lymfatických uzlin, mozku a placenty

(u těhotných žen). Pokud se infekce dostane do mozku, vyvolává meningitidu a encefalitidu. K nákaze dochází konzumací infikovaného jídla. Mezi hlavní příznaky patří bolest hlavy, horečka, malátnost, bakteriemie, abscesy na játrech, ataxie, meningitida, encefalitida a septikémie (Bhunia 2018).

Escherichia coli je gramnegativní, tyčinkovitá bakterie z čeledi Enterobacteriaceae. Přirozeně se vyskytuje ve spodní části intestinálního traktu teplokrevných živočichů a často se dostává do přírody výkaly nebo odpadními vodami. *E. coli* je využívána jako indikátor fekálního znečištění (FIB) k hodnocení kvality vody. *E. coli* neobsahuje pouze komenzální kmeny, ale také mnoho patogenních, které způsobují různá onemocnění (Jang et al. 2017). Příkladem těchto onemocnění je gastroenteritida, úplavice, hemolyticko-uremický syndrom, infekce močových cest, septikémie, zápal plic a meningitida.

Existuje 6 střevních patotypů: enterotoxigenní *E. coli* (ETEC), enteropatogenní *E. coli* (EPEC), enterohemoragické *E. coli* (EHEC), enteroagregační *E. coli* (EAEC), difúzně adherentní *E. coli* (DAEC), enteroinvazivní *E. coli* (EIEC) (Bhunia 2018). Patogenní i komenzální kmeny *E. coli* mají různé fenotypové a genotypové varianty. Existuje více než 700 sérotypů *E. coli*, které se rozlišují na základě přítomnosti somatických (O), kapsulárních (K) a flagelárních (H) antigenů. *E. coli* mohou být dále rozděleny do sedmi fylogenetických skupin: A, B1, B2, C, D, E a F. Fylogenetické skupiny se využívají k identifikaci neznámých druhů *E. coli*. Dokáží nám poskytnout důležité informace ohledně fyziologických a ekologických vlastnostech zkoumané bakterie (Jang et al. 2017).

Zástupci rodu *Shigella* spp. jsou gramnegativní, tyčinkovité fakultativně anaerobní bakterie (Bliven & Lampel 2017). *Shigella* spp. produkují 3 druhy enterotoxinů: *Shigella* enterotoxin 1, *Shigella* enterotoxin 2 a Shiga toxin. Geny pro enterotoxiny jsou uloženy na chromozomech nebo na virulenčním plasmidu. *Shigella* spp. rostou mezi 7–46 °C, ale jejich optimální teplota je 37 °C. Bakterie rodu *Shigella* spp. jsou velmi náchylné k tepelným úpravám a dají se zneškodnit pasterizací (Bhunia 2018). Tento rod je rozdělen do 4 séroskupin na základě somatických antigenů: *S. dysenteriae* (séroskupina A), *S. flexneri* (séroskupina B), *S. boydii* (séroskupina C) a *S. sonnei* (séroskupina D).

Shigella spp. je velice invazivní a patogenní skupina bakterií, která je původcem onemocnění zvané shigelóza. *Shigella* spp. se přenáší kontaktem s infikovanou osobou, fekálně-orální cestou nebo kontaminovaným jídlem a vodou (Bliven & Lampel 2017). Po překonání kyselého prostředí žaludku i kompetitivní střevní mikrobioty, se bakterie dostane do tlustého střeva a konečníku, kde proniká do sliznice. Mezi první projevy onemocnění patří horečka, bolest hlavy, malátnost, nechutenství, zvracení a vodnatý průjem. *Shigella* spp. může výjimečně způsobit také meningitidu, osteomyelitidu, artritidu a slezinový absces (Kotloff et al. 2018).

3.4 Polyfenoly

Polyfenoly jsou sekundární metabolity rostlin, které vznikají jako produkty šikimátové a acetátové metabolické dráhy. Člověk je získává z potravy, konzumací ovoce, zeleniny, obilnin, čaje, kávy nebo vína. Všechny polyfenoly obsahují aromatická jádra s nejméně jednou hydroxylovou skupinou. Polyfenoly se vyskytují ve dvou chemických strukturách. Tyto struktury se dělí podle toho, jestli na sebe mají navázané sacharidy (glykosidy) nebo existují

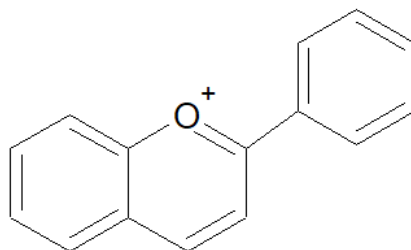
samostatně (aglykony) (Santhakumar et al. 2018). Na základě jejich chemické stavby se mohou rozdělit na flavonoidy, hydroxybenzoové kyseliny, hydroxyskořicové kyseliny, třísloviny, lignany a stilbeny (Wang et al. 2019).

Tyto chemické látky se staly hlavním předmětem mnoha výzkumů, protože vykazují antikarcinogenní, antiaterogenní, antitrombotické, protizánětlivé, antialergenní, vazodilatační a antikoagulační účinky. Polyfenoly, díky svým vlastnostem, slouží jako prevence rakoviny, ale také kardiovaskulárních chorob (Ozidal et al. 2016). K dosažení těchto zdravotních benefitů je u některých polyfenolů (zejména isoflavonů ve formě glykosidů) zapotřebí, aby byly střevní mikrobiotou přeměněny v potenciálně bioaktivnější metabolity s nízkou molekulovou hmotností (Selma et al. 2009). Předtím než se sloučeniny dostanou do lidských buněk, tkání a orgánů, podléhají nejrůznějším modifikacím. První reakce probíhají v dutině ústní po styku polyfenolů se slinami. V dalších částech trávicího traktu dochází k biotransformaci látek, které nebyly modifikovány v dutině ústní. Tyto přeměny se odehrávají prostřednictvím Fáze I (oxidace, redukce a hydrolýza), kdy probíhá beta-hydrolýza cukerných skupin v *O*-glykosidových flavonoidech a prostřednictvím Fáze II (konjugace) enzymatické detoxifikační dráhy. Výsledkem těchto reakcí jsou vodorozpustné metabolity, které se dostanou přes střevní bariéru do ostatních orgánů, a nakonec jsou vyloučeny močí (Santhakumar et al. 2018).

3.4.1 Flavonoidy

Flavonoidy jsou složeny z 15 uhlíků se 2 aromatickými jádry, které spojuje tříuhlíkatý řetězec. Vysoká koncentrace flavonoidů se nachází v krycím pletivu listů a svrchní vrstvě ovoce. U rostlin se podílejí na procesech, jako je ochrana proti UV záření, pigmentace, stimulace hlízek při fixaci dusíku a rezistence vůči chorobám. U těchto látek mohou být k hlavnímu řetězci připojeny různé substituenty (hydroxylové skupiny, cukerné jednotky, metylové skupiny a další). Zatímco cukry a hydroxylové skupiny zvyšují rozpustnost flavonoidů ve vodě, ostatní substituenty je činí rozpustné v tucích (Crozier et al. 2006). Flavonoidy se dělí na antokyany, flavanoly, flavonoly, flavanony, isoflavony a flavony (Wang et al. 2019).

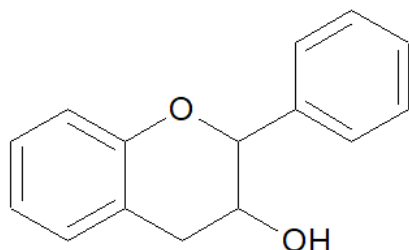
Antokyany jsou glykosidy flavyliových (2-fenylbenzopyrilium) solí s různým uspořádáním hydroxylových skupin. Jejich necukerná část se označuje jako antokyanidin. Identifikováno je přibližně 17 antokyanidinů, ale pouze 6 z nich se běžně vyskytuje v přírodě (kyanidin, delphinidin, malvidin, pelargonidin, peonidin a petunidin), základní struktura antokyanů je znázorněna na Obrázku 1.



Obrázek 1 Základní chemická struktura antokyanů

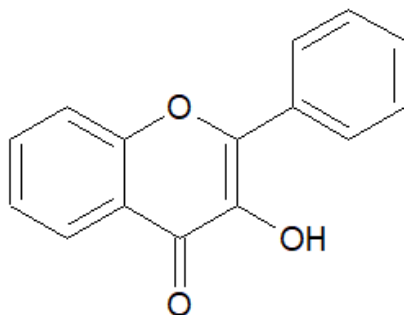
Antokyany jsou vodorozpustné látky, které vytváří modré, fialové a červené zbarvení rostlinných tkání. Nejčastěji se vyskytují v ovoci, zelenině, luštěninách, obilninách a kořenech. Důležité využití mají v potravinářském průmyslu, kde nahrazují syntetická barviva. Legislativou Evropské unie byly antokyany zařazeny mezi přírodní barviva s označením E163. Kromě jejich barvicí schopnosti, byly zjištěny i další prospěšné vlastnosti (protizánětlivé, antioxidační a antikarcinogenní), které chrání před srdečními chorobami a některými typy rakoviny (Kamiloglu et al. 2015).

Flavanoly, jejichž základní struktura je znázorněna na Obrázku 2, tvoří velkou skupinu sloučenin, která se skládá z monomerních flavanolů (katechin, epikatechin, epigalokatechin, galátové estery) a polymerických derivátů (Wang et al. 2019). Polymery flavanolů se nazývají proantokyanidiny, ale pokud jsou složeny pouze z (epi)katechinových jednotek, tak se označují jako prokyanidiny (Del Rio et al. 2013). Největší množství flavanolů se nachází v ovoci, zeleném čaji, černém čaji a čokoládě. Katechin a epikatechin patří mezi hlavní složky ovoce. Galokatechin, epigalokatechin a epigalokatechin galát jsou důležitou součástí čajů, hroznů a některých semen luštěnin (Belščak-Cvitanović et al. 2018).



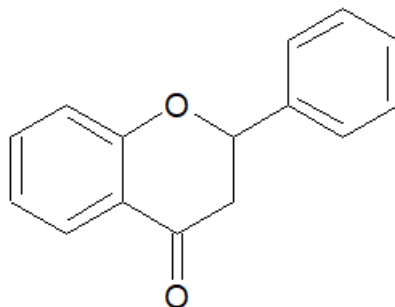
Obrázek 2 Chemická struktura flavanolu

Další podskupinou flavonoidů jsou flavonoly, jejichž základní strukturu tvoří 3-hydroxyflavon, ke kterému se v různém uspořádání připojují hydroxylové skupiny (Obrázek 3). Flavonoly podléhají v trávicím traktu střevní mikrobiotě a hydrolýzou vznikají nové metabolity (Ozidal et al. 2016). Kaempferol, kvercetin, isorhamnetin a myricetin jsou nejběžnější flavonoly, vyskytující se ve formě glykosidů. V různém množství se flavonoly nacházejí v ovoci, zelenině a nápojích. Jejich rozdílný obsah v podobných produktech je pravděpodobně závislý na lokálních pěstitelských podmínkách, sezónních změnách a odrůdových rozdílech (Del Rio et al. 2013).



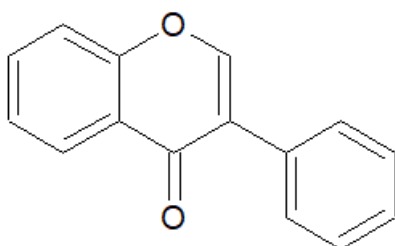
Obrázek 3 Chemická struktura flavonolu

Flavanony patří mezi jednu z nejdůležitějších skupin flavonoidů (Obrázek 4). Mohou se vyskytovat ve formě glykosidů i aglykonů. Glykosidy vznikají napojením rutinózy nebo neohesperidózy na volný aglykon. Mezi aglykony patří například hesperetin, naringenin, eriodiktyol a isosakuranetin. Příkladem významných glykosidů je hesperidin, neohesperidin, naringin, narirutin, poncirin, neoponcirin, eriocitrin a neoeryocitrin. Hlavním přírodním zdrojem flavanonů pro člověka jsou citrusové plody (Barreca et al. 2017).



Obrázek 4 Chemická struktura flavanonu

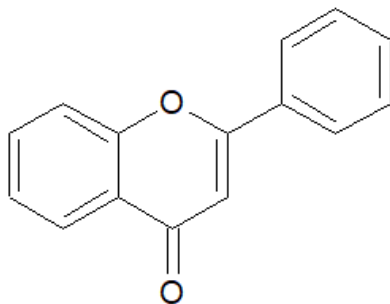
Isoflavony (Obrázek 5) se vyskytují jak ve formě aglykonů (daidzein, genistein, glycitein, formononetin, Biochanin A), tak ve formě glykosidů (daidzin, genistin, glycitin, ononin, sissotrin atd.) (Hughes & Woods 2003). Hlavním zdrojem isoflavonů je převážně zelenina (sójové boby, fazole, cizrna), ale v menším množství se nacházejí i v ovoci a ořechách. Největší obsah isoflavonů je v sójových bobech, přibližně 1,5 mg/g (Křížová et al. 2019). Mezi nejvýznamnější isoflavon sóji patří daidzin (glykosid daidzeinu), který je metabolizován střevními bakteriemi nejprve na daidzein a dihydrodaidzein, následně na equol (3-(4-hydroxyfenyl)-7-chromanol) a *O*-desmethylangolensin. Jetel luční, jetel plazivý a tollice vojtěška, jež se využívají ke krmení hospodářských zvířat, jsou rovněž dobrým zdrojem isoflavonů. Isoflavony se dají využít i v oblasti lékařství jako alternativní léčba některých typů rakoviny, kardiovaskulárních chorob, osteoporózy a symptomů menopauzy (Křížová et al. 2019).



Obrázek 5 Chemická struktura isoflavonu

Flavony jsou poslední zmíněnou skupinou, která se řadí mezi flavonoidy. Chemickou stavbou, jenž je znázorněna na Obrázku 6, se velmi podobají flavanolům, které navíc nesou hydroxylovou skupinu. Podléhají široké škále modifikací, zahrnující hydroxylaci, metylaci, *O*- a *C*-alkylaci a glykosylaci (Crozier et al. 2006). Glykosidové formy flavonů jsou vytvářeny z aglykonů, mezi které patří apigenin, akacetin, luteolin, diosmetin a chrysoeriol. Flavony získané z rostlin se nejčastěji vyskytují ve formě 7-*O*-glykosidů, které na sebe mohou mít navázanou acetylovou nebo malonylovou skupinu. Příkladem je apigenin-*O*-glykosidu, jehož

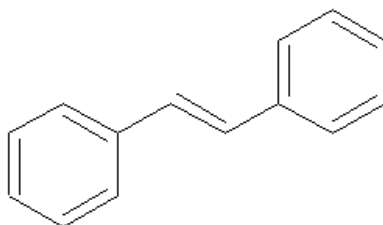
nejvyšší koncentrace se nachází v usušeném heřmánku pravém (5010–5320 mg/100 g) a petrželi (1200–1350 mg/100 g). Další zjištěné výskyty flavonů jsou v citrusových plodech, čajích, mátě, obilninách, luštěninách a zelenině. V rostlinách flavony splňují různé funkce, například pomáhají při zbarvování květů a ochraně proti UV záření, hmyzu a houbovým chorobám. Pozitivní vlastnosti se projevují i v lidském organismu, kde působí antioxidačně, protizánětlivě, antikarcinogenně a antimikrobiálně. (Hostetler et al. 2017).



Obrázek 6 Chemická struktura flavonu

3.4.2 Stilbenoidy

Základní chemická struktura stilbenoidů (Obrázek 7) se skládá ze dvou aromatických jader, která jsou propojena etylenovým můstkem a následně na ně mohou být vázány substituenty. Díky dvojné vazbě mohou stilbenoidy existovat ve formě *cis*- a *trans*-izomerů, ale *trans*-forma je více stabilní, biologicky aktivnější a vyskytuje se častěji (Dvorakova & Landa 2017).

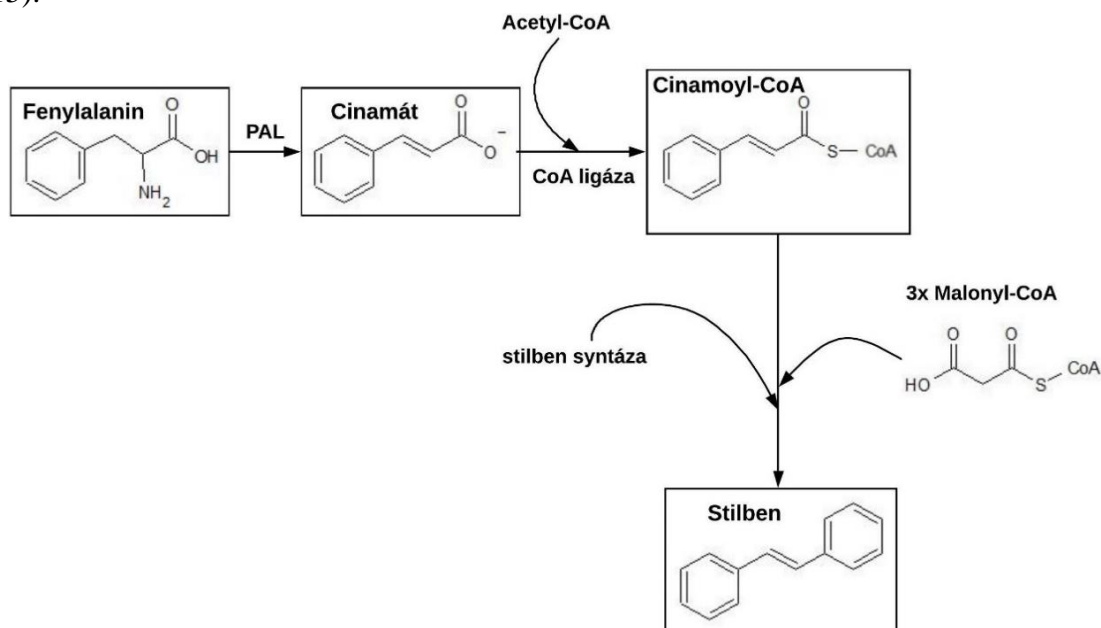


Obrázek 7 Základní chemická struktura stilbenoidů

Stilbenoidy jsou syntetizovány v rostlinách skrze fenylpropanoidovou dráhu (znázorněna na Obrázku 8). Chemický proces začíná přeměnou fenylalaninu na cinamát za účasti fenylalanin amoniak lyázy (PAL). Cinamát se následně spojuje s acetyl-CoA a vzniká cinamoyl-CoA, který je v dalším kroku za účasti stilben syntázy a 3 molekul malonyl-CoA převeden na stilben (Akinwumi et al. 2018).

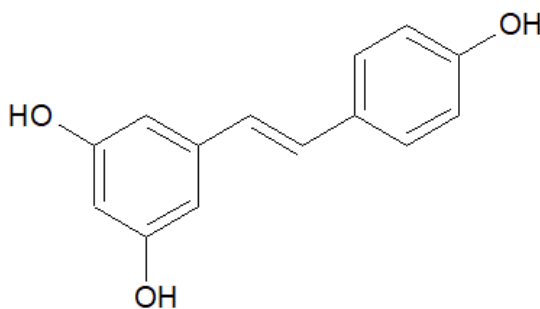
Stilbeny jsou součástí mnoha rostlin a stromů včetně révy vinné (*Vitis vinifera*), podzemnice olejné (*Arachis hypogaea*), čiroku dvoubarevného (*Sorghum bicolor*), brusnice borůvky (*Vaccinium myrtillus*), borovic (*Pinus* spp.) a smrků (*Picea* spp.) (Reinisalo et al. 2015). Biosyntéza stilbenů např. v révě vinné může být geneticky určena podle druhu i odrůdy, ale lze ji také pozměnit zemědělskými a enviromentálními faktory (půda, teplota, patogeny aj.) (El Khawand et al. 2018). Látky získané z těchto a dalších rostlin (resveratrol, pterostilben, pinosylvin) mají pozitivní vliv na zdraví člověka. Hlavními benefity jsou kardiovaskulární,

chemopreventivní, antiobezitní, antidiabetické a neuroprotektivní vlastnosti (Reinisalo et al. 2015).



Obrázek 8 Schéma syntézy stilbenů

Monomery stilbenoidů, které svou strukturou souvisejí s resveratrole (Obrázek 9), lze rozdělit do 5 rozdílných skupin: hydroxylované sloučeniny (piceatanol, gnetol, oxyresveratrol), dehydroxylované sloučeniny (pinosylvin), metylované sloučeniny (pinostilben, pterostilben, rhapontigenin, isorhapontigenin), isoprenylované sloučeniny (arachidin-1, arachidin-3) a glykosylované deriváty resveratrolu (piceid) (El Khawand et al. 2018).



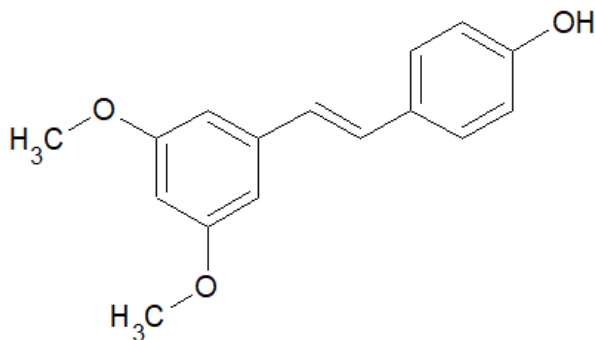
Obrázek 9 Resveratrol

Resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-*trans*-stilben) je fytoalexin vznikající nejvíce v křídlatce japonské (*Polygonum cuspidatum*), révě vinné a arašídech. Uvádí se, že resveratrol má člověku prospěšné antioxidantní, protinádorové, antivirové a protizánětlivé vlastnosti, které jsou předpokládánymi benefity pro dlouhověkost (Jung et al. 2009). V souvislosti s konzumací červeného vína se často mluví o tzv. francouzském paradoxu. Tímto pojmem označujeme skutečnost, že ve Francii je navzdory rizikovým faktorům (vyšší konzumace nasycených mastných kyselin, např. máslo, sýry, fois gras apod.) výrazně nižší úmrtnost na kardiovaskulární choroby, než je tomu například ve Velké Británii a Spojených státech amerických (Renaud & de Lorgeril 1992). Tento paradox byl vysvětlen mírnou a pravidelnou konzumací červeného vína a v něm obsaženém resveratrolu (Kopp 1998).

Dalším benefitem resveratrolu je schopnost inhibovat růst bakterií, například *Helicobacter pylori*, *Chlamydia pneumoniae* (Mahady & Pendland 2000; Schriever et al. 2003), *Neisseria meningitidis*, *Propionibacterium acnes* (Docherty et al. 2001, 2007), *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* a *Pseudomonas aeruginosa* (Chan 2002).

Resveratrol je v lidském organismu velmi rychle vstřebáván a metabolizován. Vznikají metabolity s rozdílnou chemickou strukturou a biologickými vlastnostmi, které mohou mít jiné projevy na zdraví člověka. Během experimentu s využitím vzorků stolice, bylo pomocí kapalinových chromatografů dokázáno, že na přeměně resveratrolu se podílejí střevní bakterie. Byly nalezeny jeho 3 metabolity: dihydroresveratrol, *trans*-3,4'-dihydroxystilben a 3,4'-dihydroxybibenzyl (lunularin) (Bode et al. 2013). V další studii však byl zjištěn pouze jeden metabolit (dihydroresveratrol), což mohlo být způsobeno rozdílným bakteriálním složením vzorků stolice nebo jinou počáteční koncentrací stilbenoidů. Tyto odlišné parametry zřejmě saturovaly katabolické dráhy a pozměnily způsob tvorby metabolitů (Jarosova et al. 2019).

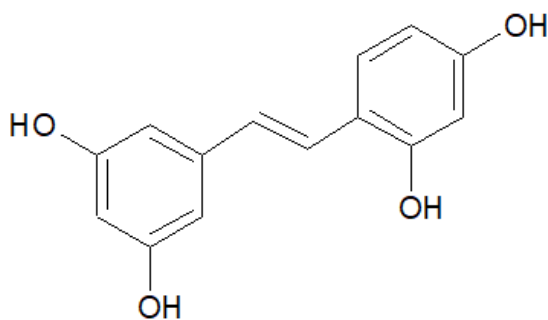
Další známý stilbenoid se nazývá pterostilben (*trans*-3,5-dimethoxy-4'-hydroxystilben), což je dimetyléterový derivát resveratrolu (Obrázek 10). Pterostilben obsahuje dvě methoxy skupiny, díky kterým je třikrát až čtyřikrát biologicky dostupnější než resveratrol a také více lipofilní (Kapetanovic et al. 2011). Pterostilben obsahuje dimetyléterovou strukturu s pouze jedinou hydroxylovou skupinou, která způsobuje nižší náchylnost ke konjugaci s kyselinou glukuronovou a sulfonovou. Tento fakt by mohl být důvodem toho, proč je pterostilben lépe metabolicky stabilní než resveratrol (Wang & Sang 2018). Největší množství pterostilbenu se nachází v borůvkách (*Vaccinium* spp.) a dalších bobulích (Rivière et al. 2012). Tsai et al. (2017) uvádí, že pterostilben vykazuje inhibující vlastnosti proti rakovině prsu, prostaty a střeva. Mezi jeho další benefity patří snížení LDL (lipoprotein s nízkou hustotou) cholesterolu, udržování správných hodnot glukózy v krvi a protizánětlivé účinky.



Obrázek 10 Pterostilben

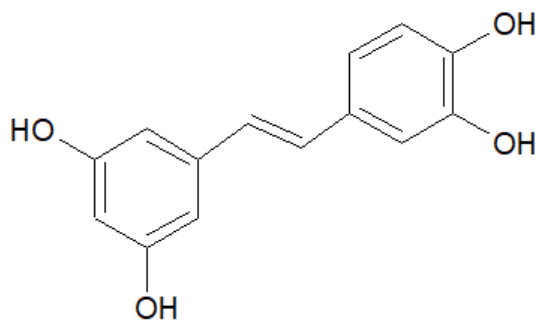
Mezi deriváty resveratrolu se řadí také oxyresveratrol (2',3,4',5-tetrahydroxystilben), který má svou chemickou strukturu obohacenou o jednu hydroxylovou skupinu (Obrázek 11). Hydroxylová skupina zajišťuje lepší rozpustnost ve vodě a tato vlastnost představuje výhodu pro aplikaci oxyresveratrolu jako nutriční složky (Chen et al. 2016). Oxyresveratrol se získává například z přestupu čínskému (*Smilax china*), morušovníku bílého (*Morus alba*), chlebovníku různolistého (*Artocarpus heterophyllus*), kýchavice černé (*Veratrum nigrum*) a kamyšníku přímořského (*Scirpus maritimus*) (Xu et al. 2014). Povichit et al. (2010) během své studie stanovili silnou antioxidační aktivitu oxyresveratrolu, u které byla prokázána téměř dvakrát vyšší účinnosti než u resveratrolu. V dalších výzkumech

byly zjištěny i jiné benefity, jako je například schopnost inhibovat virus HIV-1 (Likhitwitayawuid et al. 2005), rakovinou tvorné buňky (Wu et al. 2010) a bakterie *Staphylococcus aureus*, *Salmonella abony*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus flavus*, *Streptococcus faecalis* (Mazimba et al. 2011). Jarosova et al. (2019) svým výzkumem dokazují, že oxyresveratrol je intenzivně metabolizován střevní mikrobiotou na nové metabolity. Pojmenován byl však pouze 2',3,4',5-tetrahydroxybibenzyl, který vznikl redukcí dvojně vazby oxyresveratrolu. Po dosažení maximální koncentrace zmíněného metabolitu, dochází k dalším reakcím a degradaci v dosud neznámé produkty.



Obrázek 11 Oxyresveratrol

Piceatanol (3,5,3',4'-tetrahydroxystilben), znázorněný na Obrázku 12, je hydroxylovanou obdobou resveratrolu a vyskytuje se v mučence jedlé (*Passiflora edulis*), křídlatce japonské (*Polygonum cuspidatum*), kajeputu bělavém (*Melaleuca leucadendron*), rebarboře (*Rheum* spp.), révě (*Vitis* spp.), brusnici (*Vaccinium* spp.) a dalších rostlinách (Piotrowska et al. 2012). Jak u předešlých stilbenoidů, tak i u piceatanolu byly zjištěny různé zajímavé vlastnosti: vazorelaxační účinek, podpora syntézy kolagenu, inhibice melanogeneze, ochrana kůže před UVB zářením, regulace projevu endoteliální syntézy oxidu dusnatého a snížení hladiny glukózy v krvi (Uchida-Maruki et al. 2015). Jarosova et al. (2019) uvádí, že piceatanol podléhá metabolické transformaci mikrobiotou tlustého střeva za vzniku nových produktů. Mezi nejrychlejší metabolický proces piceatanolu patří hydrogenace etylenového mostu a tím vytvoření dihydropiceatanolu, který je dále přeměňován v nové sloučeniny. Méně častějším metabolitem je 3,3',4'-trihydroxystilben nebo 3',4',5-trihydroxystilben, jenž vzniká dehydroxylací na jedné z meta pozic aromatického jádra A. Tyto trihydroxystilbeny se následně metabolizují na 3,3',4'-trihydroxybibenzyl.



Obrázek 12 Piceatanol

3.5 Vliv polyfenolů na mikrobiom

Polyfenoly jsou známy díky svým antioxidačním a protizánětlivým vlastnostem, ale mají i prebiotickou funkci, která se projevuje na složení bakterií v tlustém střevě. Konzumace potravin s obsahem polyfenolů zvyšuje tvorbu mikrobiálních metabolitů (zejména mastných kyselin s krátkým řetězcem), jež jsou nápomocné při udržování střevní homeostázy a celkového zdraví střevního epitelu (Zhu 2018). Prebiotický efekt polyfenolů je dokázán studii využívající fermentaci v uzavřených *in vitro* modelech střeva (Mandalari et al. 2010; Fogliano et al. 2011), ale i klinickými výzkumy (Okubo et al. 1994; Jin et al. 2012), při kterých byly využity produkty bohaté na polyfenolické látky (čaje, ořechy, čokolády a další). Jejich aktivita je závislá na složení střevní mikrobioty, které se liší u každého jedince. Z důvodu této velké interindividuální různorodosti se pozitivní zdravotní účinky polyfenolů projevují pouze u někoho (Tomás-Barberán et al. 2016). Mezi střevní mikrobiotou a polyfenoly existuje vzájemný vztah, který je založený na tom, že mikrobiota ovlivňuje vstřebávání polyfenolů a polyfenolové metabolity (biologicky aktivnější) působí na růst jednotlivých bakteriálních druhů (Valdés et al. 2015). Zmíněné působení je velmi závislé na chemické struktuře polyfenolů, jejich koncentraci a na daném typu bakterií. Vliv polyfenolů na grampozitivní bakterie je více intenzivní než na gramnegativní, což je pravděpodobně způsobeno odlišnou stavbou buněčných stěn (Cardona et al. 2013).

Duda-Chodak 2012 ve své *in vitro* studii zkoumá vliv flavanonů (naringenin, naringin, hesperetin, hesperidin) a flavonolů (kvercetin, rutin) na vybrané intestinální bakterie (*Bacteroides galacturonicus*, *Lactobacillus* sp., *Enterococcus caccae*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Ruminococcus gauvreauii* a *Escherichia coli*), během které bylo zjištěno, že aglykony (kvercetin, hesperetin, naringenin) mají na bakterie mnohem vyšší inhibiční efekt než glykosidy (naringin, rutin, hesperidin). Lee et al. 2006 se zaměřili na studium epikatechinu a katechinu, vyskytujících se například v čajích. U těchto látek, ale také dalších polyfenolických složek čajů (3-*O*-methylgallová kyselina, kyselina gallová a kyselina kávová), byla zjištěna schopnost potlačovat růst *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Bacteroides* spp., v menší míře i komenzálních druhů *Clostridium* spp., *Bifidobacterium* spp. a probiotického druhu *Lactobacillus* spp. U katechinu byl během další studie navíc pozorován nárůst *Clostridium coccooides*, *Bifidobacterium* spp. a *Escherichia coli*, ale současně zpomalení vývoje *Clostridium histolyticum* (Selma et al. 2009). Zmíněné složky čajů (katechin, epikatechin) včetně epigalokatechin galátu, epikatechin galátu, epigalokatechinu a galokatechinu jsou dle Duda-Chodak et al. 2015 schopny inhibovat i patogenní mikroorganismy, jako je například *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* a *Pseudomonas aeruginosa*.

Další zkoumanou potravinou je kakao, získávané z kakaovníku pravého (*Theobroma cacao*), jež obsahuje ve velké míře flavanoly (epikatechin, katechin, proantokyanidiny) (Etxeberria et al. 2013). V posledních letech se kakao stalo předmětem mnoha výzkumů, protože jeho složky mají pozitivní vliv na zvýšený krevní tlak, oxidaci LDL-cholesterolu a také mění citlivost na inzulin (Valdés et al. 2015). Studie probíhají jak na zvířatech, tak na lidech, ale výsledky se od sebe liší. Během pokusu na potkanech (kmen Wistar, samice) byl v jejich fekální mikrobiotě zjištěn pokles bakterií *Bacteroides* spp., *Staphylococcus* spp.

a *Clostridium* spp. Naopak u lidí se projevil nárůst *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. i *Enterococcus* spp., ale také úbytek *Clostridium histolyticum* (Ettxeberria et al. 2013).

Kromě velkého zájmu o polyfenolické látky z čajů a kaka, jsou hojně uskutečňovány studie založené na zkoumání vztahu mezi mikrobiotou a složkami červených vín. V červeném vínu se nacházejí jak flavonoidní (flavanoly, antokyany), tak ne flavonoidní látky (resveratrol, cinamát, kyselina gallová) (Ettxeberria et al. 2013). Denní konzumací 250 ml červeného vína lze do těla dodat 210 mg polyfenolů. Většina těchto přijatých polyfenolů se dostává do tlustého střeva, kde jsou střevními bakteriemi přeměněny na nové látky, jež dále ovlivňují složení střevní mikrobioty (Cueva et al. 2016). Moreno-Indias et al. (2016) provedli studii, při které 20 mužů (10 zdravých a 10 s metabolickým syndromem, v rozmezí 45–50 let) po dobu 30 dnů konzumovali červené víno s alkoholem i bez alkoholu. Ačkoliv byli muži rozděleni na dvě skupiny, pozorované změny ve složení mikrobioty se u nich podstatně nelišily. Příkladem je pokles množství *Bacteroides* spp., inhibiční efekt na růst *Clostridium histolyticum* a pozitivní vliv na růst *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Blautia coccooides*, *Faecalibacterium prausnitzii* a *Roseburia* spp. Známý jsou také výsledky z výzkumu na potkanech, u kterých se po krmení polyfenoly z červeného vína projevila jednak převaha rodu *Lactobacillus* spp., ale i *Bifidobacterium* spp. nad původně vysokým množstvím bakterií rodu *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp. a *Propionibacterium* spp. (Cueva et al. 2016).

Jaimés et al. (2019) zkoumali efekt 6 stilbenoidů (batatasin III, oxyresveratrol, *trans*-resveratrol, piceatanol, pinostilben a thunalben) na střevní mikrobiotu. K výzkumu byla využita *in vitro* fermentace stilbenoidů se vzorky stolice od 4 dárců. Výsledný vliv stilbenoidů na mikrobiotu byl vyhodnocen pomocí sekvenace genu pro 16S rRNA. Bylo zjištěno, že resveratrol a ostatní stilbenoidy snižují poměr kmene bakterií Firmicutes ku Bacteroidetes. Při vyhodnocení byl zjištěn také pokles relativního množství bakterií z rodu *Clostridium*, bakterií z čeledi Lachnospiraceae a nárůst relativního množství *Faecalibacterium prausnitzii*.

Vliv polyfenolů na střevní mikrobiotu je studován také u isoflavonů (daidzein, genistein, glycitein) ze sóji (*Glycine max*), ale jejich působení na bakterie není dosud zcela jasné. Z výzkumů na postmenopauzálních ženách je prokázáno, že dávka 80 mg sójových isoflavonů nezpůsobuje žádnou změnu ve složení bakterií. Avšak u dávky 160 mg byl u všech testovaných pozorován nárůst *Bifidobacterium* spp. a pokles *Lactobacillus* spp. Dávka 100 mg dokázala zvýšit počet *Clostridium* spp., *Eubacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Faecalibacterium* spp. a *Bifidobacterium* spp. Kromě množství isoflavonů, ovlivňuje jejich působení také schopnost jedince metabolizovat daidzein na equol, protože ne u všech tento metabolický proces probíhá (Huang et al. 2016).

3.6 Metabolismus stilbenoidů

Metabolické reakce polyfenolů jsou katalyzovány enzymy (cytochromy P450, sulfotransferázy, uridin-5'-difosfát-glukuronosyltransferázy, katechol-*O*-metyltransferázy), které se nejvíce projevují ve střevech a v játrech. Důležitou roli hraje také střevní mikrobiota, protože dokáže přeměnit některé původní látky na nové metabolity (Wang et al. 2019).

Cytochromy P450 (CYP) jsou enzymy, které zprostředkovávají metabolismus látek ve fázi I a jsou obsaženy ve většině tkáních a orgánech (Gao & Hu 2010). Fáze I je metabolická

dráha, zahrnující oxidaci, redukci, hydrolýzu, hydrataci, dethioacetylaci a izomeraci (Gibson & Skett 1986).

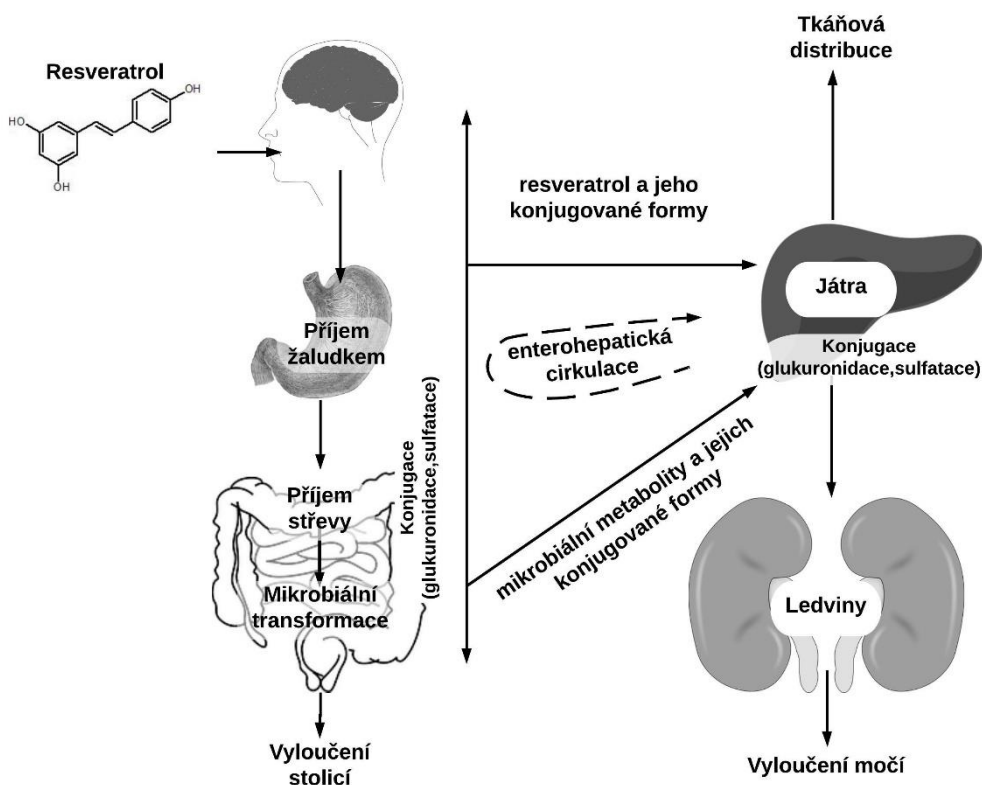
El Khawand et al. (2018) uvádí, že glukuronidace a sulfatace jsou nejčastěji probíhající reakce během anabolismu stilbenoidů, ale například u oxyresveratrolu a piceatanolu byla pozorována také metylace. Glukuronidace a sulfatace patří mezi reakce metabolismu probíhající ve Fázi II. Konjugace látek prostřednictvím těchto reakcí, zvyšuje jejich polaritu a rozpustnost ve vodě, což napomáhá ke konečnému vyloučení z těla (Gao & Hu 2010). Za glukuronidaci jsou zodpovědné enzymy uridin-5'-difosfát-glukuronosyltransferázy (UGT), které jsou rozděleny do 4 skupin UGT1, UGT2, UGT3 a UGT8. Hlavní roli pro polyfenoly má podskupina enzymů UGT1A a její izoformy (1A1, 1A3, 1A7, 1A8, 1A9, 1A10) (Wang et al. 2019). Největší obsah UGT1A se nachází v tkáni tenkého střeva, kde se z velké části projevují izoformy UGT1A10 a 1A1. Jiné izoformy se do glukuronidace zapojují v játrech (UGT1A4, 1A1, 1A6, 1A9) a v ledvinách (UGT1A9) (Springer & Moco 2019). Projev UGT v tenkém střevě je sice mnohem nižší než v játrech, ale glukuronidace v něm stále probíhá. Hlavní důvod je takový, že tenké střevo je prvním orgánem, který se ve vysokých koncentracích setkává se vstřebanými látkami (Gao & Hu 2010). Druhou důležitou reakcí je sulfatace, probíhající za katalyzace sulfotranferázami (SULT). SULT můžeme rozdělit do 4 skupin: SULT1, SULT2, SULT4 a SULT6. U polyfenolů zastává významnou roli skupina SULT1 a v menší míře SULT2 (Wang et al. 2019). Podskupina SULT1A a její izoformy jsou hlavními katalyzátory sulfatace resveratrolu, kdy vzniká resveratrol-3,4'-*O*-disulfát (SULT1A2, SULT1A3), resveratrol-3-*O*-sulfát (SULT1A2, SULT1A3) nebo resveratrol-4'-*O*-sulfát (SULT1A2) (Springer & Moco 2019).

Po úspěšném průběhu glukuronidace a sulfatace, vzniklé metabolity prochází skrz apikální membránu tenkého střeva do lumenu, nebo se mohou dostat i přes bazolaterální membránu a vstoupit do krevního řečiště (Dietrich 2003). Metabolity, které pronikly do krevního řečiště, mají možnost se vázat na proteiny přítomné v krvi (lipoproteiny, hemoglobin, albumin) a být transportovány do tkání jiných orgánů (ledviny, játra a další). Enterocyty (absorpční epitelové buňky) obou membrán tenkého střeva, obsahují proteiny ze skupiny ABC (vázájící ATP), jež napomáhají k vstřebávání a transportu metabolitů (Springer & Moco 2019). Absorpce v tenkém střevě je velmi nízká, pohybuje se v rozmezí 10–20 %. Látky, které se zde nevstřebaly, pokračují do tlustého střeva, kde jsou transformovány a degradovány střevní mikrobiotou. Mikrobiota přítomná v tlustém střevě vytváří enzymy, jež se podílejí na deglykosylaci, dehydroxylaci a demetylaci. Díky těmto reakcím, vznikají nové produkty, které jsou následně z těla vyloučeny močí a výkaly (Pathak et al. 2018).

V závislosti na různorodosti mikrobioty, nevznikají u všech jedinců stejné metabolity a zároveň některé stilbenoidy (například batatasin III nebo pinostilben) zůstávají ve své původní formě (Jarosova et al. 2019).

V případě resveratrolu, metabolismus znázorněný na Obrázku 13 probíhá následovně. Látka prochází trávicím traktem do tenkého střeva, kde má možnost se vstřebávat. V tenkém střevě, ale i v játrech je resveratrol metabolizován v glukuronidové a sulfátové formy, které mohou být vylučovány močí, nebo jsou pomocí enzymů přeměněny zpět na základní formu resveratrolu. V těle probíhá také enterohepatická cirkulace, díky které se resveratrol může zpětně vstřebávat ve střevě. Nevstřebaný resveratrol podléhá mikrobiální transformaci na metabolity, jež také mohou projít glukuronidací i sulfatací. Po všech proběhlých reakcích,

nastává vyloučení nevstřebaných metabolitů a případně nevstřebaného resveratrolu stolicí (Bird et al. 2017).



Obrázek 13 Schéma metabolismu resveratrolu (Bird et al. 2017)

3.7 Vliv stilbenoidů na zdraví člověka

Stilbenoidy, jež vykazují protizánětlivou, antioxidační a neuroprotektivní aktivitu, jsou považovány za látky působící převážně proti chronickým nemocem, které jsou spojovány s věkem (diabetes mellitus, obezita, rakovina, kardiovaskulární choroby, neurodegenerativní onemocnění) (Navarro et al. 2018). V potravě se často nenacházejí samostatně, ale spíše v kombinaci s jinými polyfenoly (Dvorakova & Landa 2017). Důležité je zmínit, že stilbeny jsou využívány zejména jako prevence, která může bránit v rozvoji zánětlivých onemocnění, ale nemusí být tak účinné již u probíhajících nemocí. (Dvorakova & Landa 2017).

Díky svým chemickým a fyzikálním vlastnostem, jsou schopny pasivně procházet skrz buněčné membrány nebo reagovat s membránovými receptory. Na základě této schopnosti, může být spuštěn jejich mechanismus na buněčné úrovni aktivací nitrobuněčných mechanismů, vazbou na membránové receptory nebo působením uvnitř buněčného jádra (Gambini et al. 2015). Mezi důležité mechanismy stilbenů patří inhibice transkripčního faktoru NF- κ B (nukleární faktor kappa B), cyklooxygenáz (COX-1, COX-2), CYP, indukovatelných syntáz oxidu dusnatého (iNOS), produkce prostaglandinů, aktivace jaderných receptorů (například estrogenové receptory), regulace zánětlivého mediátoru TNF- α (faktor nádorové nekrózy alfa) a další. Prostřednictvím zmíněných procesů (zabránění vzniku prostaglandinů, inhibice iNOS, COX-1, COX-2, NF- κ B, ...) a modifikace syntézy eikosanoidů, jsou stilbenoidy

schopny působit v lidském těle protizánětlivě (Rimando & Suh 2008). Inhibice aktivity transkripčního faktoru NF- κ B v mikroglíích, chrání před dopaminergní neurodegenerací, která bývá vyvolána lipopolysacharidy (Akinwumi et al. 2018). Protizánětlivá aktivita působící na lidské tenocyty a cévní endotelové buňky je ovlivněna také aktivací sirtuinu SIRT1 (Dvorakova & Landa 2017). Anekonda (2006) uvádí možnou roli SIRT1 v ochraně neuronů před reaktivními sloučeninami kyslíku (ROS), peroxidem vodíku (H_2O_2), oxidem dusnatým (NO) a extracelulárními plaky amyloid beta ($A\beta$). Agregace $A\beta$ plaků v částech mozku (hipokampus, mozková kůra) je nežádoucí, protože hraje důležitou roli v patogenezi Alzheimerovy choroby. Další nevítanou schopností $A\beta$ je to, že vyvolává peroxidaci lipidů, oxidaci proteinů a oxidaci DNA. Těmito procesy dochází k oxidačnímu narušení neuronů v mozku (Akinwumi et al. 2018). Zabráněním působení zmíněných látek, se předpokládá, že se sníží poškození mozku u lidí, kteří trpí Alzheimerovou chorobou nebo jiným neurologickým onemocněním (Huntingtonova choroba, axotomie, cévní mozková příhoda, epilepsie, mrtvice).

Doré (2005) ve svém článku zmiňuje, že resveratrol působí v různých směrech na aktivitu hemoxygenázy. Hemoxygenáza je enzym, jenž katalyzuje reakci, při které dochází k degradaci hemu za uvolnění atomu železa, oxidu uhelnatého a biliverdinu, jenž je následně přeměněn na bilirubin. Všechny vzniklé produkty působením hemoxygenázy vykazují pozitivní vlastnosti. Biliverdin i bilirubin jsou významnými antioxidanty a uvolněný oxid uhelnatý má cytoprotektivní a protizánětlivé vlastnosti (Kim et al. 2012). Štěpení hemu a ovlivňování aktivity hemoxygenázy resveratrolem, se zdají být procesy, které chrání buňky před poškozením volnými radikály, mají vazodilatační efekt a vykazují neuroprotektivní vlastnosti (Doré 2005). Je pravděpodobné, že resveratrol společně s hemoxygenázou může ovlivňovat další antioxidantní a cytoprotektivní dráhy (Kim et al. 2012). Vliv resveratrolu na apoptózu nervových buněk i jeho protizánětlivé účinky se dají využít při vývoji opatření proti neurodegenerativním chorobám (Doré 2005).

Stilbenoidy působí také jako antioxidanty, tím že potlačují oxidační poškození a snižují oxidační stres, čímž mohou sloužit jako prevence před onemocněními, jako je například rakovina (Sirerol et al. 2016). Jedním z důležitých dějů je aktivace transkripční cesty nukleárního faktoru Nrf2 (jaderný faktor odvozený od erytroidu), který řídí hlavní mechanismus buněčné obrany a je důležitý pro udržení buněčné homeostázy. Rychlá aktivace tohoto faktoru hraje významnou roli v prevenci neurodegenerativních onemocnění, kardiovaskulárních chorob, plicní fibrózy, ale také již zmíněné rakoviny (Kosuru et al. 2016). Resveratrol patří mezi stilbenoidy, které inhibicí COX-2 ovlivňují všechny kroky karcinogeneze (iniciace, promoce, progresse). Důvodem je fakt, že COX-2 působí na syntézu prostaglandinů, jejichž zvýšená produkce má vliv na metabolismus karcinogenních buněk, šíření nádorových buněk a může být zodpovědná za potlačení růstu nádorů (Sirerol et al. 2016). Stilbenoidy inhibují růst nádorových buněk nejen již zmíněným způsobem, ale také snížením projevu NF- κ B a regulací buněčného cyklu. Protirakovinný efekt zaleží na typu nádorových buněk, velikosti léčebné dávky a na způsobu podání (Navarro et al. 2018). Nutakul et al. (2011) pozorovali rozdíl mezi působením resveratrolu a pterostilbenu na 3 druhy rakovinných buněk tlustého střeva (HT29, HCT116, Caco-2). Pterostilben oproti resveratrolu, vykazoval téměř 3krát vyšší inhibiční efekt na buňky HT29, 4krát vyšší na HCT116 a 1,5krát vyšší na buňky Caco-2. Lepší výsledky pterostilbenu byly pozorovány i při působení na apoptózu. Například

při koncentraci 25 μM , pterostilben zvýšil hladinu apoptických buněk na 14,7 %, zatímco resveratrol při stejné koncentraci nevyvolal výraznou změnu (Nutakul et al. 2011).

Resveratrol má ve fyziologických koncentracích (například po konzumaci červeného vína) pozitivní vliv na kardiovaskulární soustavu, čehož dosahuje prostřednictvím několika procesů. Prvním z nich je zvýšení projevu syntázy oxidu dusnatého. Tento enzym se podílí na syntéze oxidu dusnatého, který má vazodilatační účinek v cévních endotelových buňkách. Resveratrol současně vyvažuje účinek endotelinu, což je látka způsobující zužování cév. Těmito procesy poskytuje ochranu před vznikem krevních sraženin a brání aterogenezi. Dalším pozitivním dějem je snížení aktivity COX-2 a současně inhibice produkce prostaglandinů. Díky této reakci má resveratrol možnost zabránit ateroskleróze (zánětlivé onemocnění cév). Hlavní příčinou aterosklerózy je oxidace LDL cholesterolu a jeho ukládání do cévních stěn. Resveratrol může chránit endotelové buňky před poškozením tím, že omezuje oxidaci LDL i jeho vstřebávání do cévních stěn. Kromě zmíněných dějů resveratrol snižuje produkci reaktivních sloučenin kyslíku, zlepšuje ischemicko reperfuční poškození, pomáhá redukovat komorovou arytmií a také snižuje krevní tlak (Petrovski et al. 2011). Wang et al. (2012) zmiňují, že kromě zabránění oxidace LDL, působí resveratrol proti ateroskleróze snížením koncentrace triglyceridů v séru a lipoproteinů s velmi nízkou hustotou. Tyto protiaterosklerotické reakce doprovází další pozitivně působící děje, jako je inhibice zánětlivých drah v makrofázích, prevence proliferace (hojné množení) buněk hladkého svalstva a podpora endoteliální funkce. Resveratrol má mimo jiné vliv i na reverzní transport cholesterolu, což je proces, kterým se přebytek cholesterolu z periferních tkání vrací do jater a je vylučován žlučí. Významným enzymem reverzního transportu cholesterolu je cholesteryl ester transfer protein, jehož zvýšená aktivita způsobuje vysokou hladinu LDL a tím přispívá ke vzniku aterosklerózy. Avšak léčba resveratolem snižuje projev tohoto enzymu, zvyšuje hladinu lipoproteinů s vysokou hustotou (HDL) a také podporuje schopnost HDL zprostředkovat odtok cholesterolu (Wang et al. 2012).

3.8 *In vitro* modely trávicí soustavy

Trávicí soustava je ovlivňována nejrůznějšími složkami jídla, které mohou mít přímý nebo nepřímý vliv na zdraví člověka. Existuje velké množství *in vitro* modelů, jež jsou zaměřené na různé procesy probíhající v trávicí soustavě (trávení, fermentace, vstřebávání látek, imunitní a enteroendokrinní reakce) a pomocí těchto modelů lze zjistit vliv jednotlivých složek potravy na lidské zdraví (Venema 2015). *In vitro* modely jsou oproti *in vivo* rychlejší, levnější, lze je opakovat a nejsou vázány na etická omezení (Van De Wiele et al. 2007). Avšak výsledky z *in vitro* a *in vivo* výzkumů se mohou lišit, protože je velmi náročné napodobit komplex fyzikálně-chemických a fyziologických procesů, probíhající v lidském a zvířecím těle (Hur et al. 2011).

Prvním druhem *in vitro* pokusů jsou statické metody (biochemické metody), které se řadí mezi ty nejjednodušší. Tyto metody nenapodobují fyzikální procesy (míchání, hydratace, peristaltika a další), ale pouze fyziologické podmínky podobné těm, jež jsou v lidském těle (Venema 2015). Procesy trávení v dutině ústní, žaludku a tenkém střevě jsou prováděny ve dvou po sobě navazujících krocích. Během těchto kroků se substrát nechává inkubovat s uměle vytvořenou žaludeční a trávicí tekutinou tenkého střeva po stanovenou dobu. V průběhu inkubace se pomocí pH-statu nebo pufru udržuje pH na konstantní hodnotě. Tento

postup umožňuje provádět metody, které jsou relativně jednoduché a zároveň vhodné pro vysoce výkonné testování. Avšak kontrolované podmínky v *in vitro* modelech neumožňují komplexní interakci mezi jídlem a tělem, což se často považuje za hlavní nevýhodu (Minekus et al. 2014). Statické modely se využívají především k výzkumu trávení jednoduchých potravin nebo jejich jednotlivých složek. Z pokusů lze vyhodnotit složení potravin, strukturu potravin, interakce mezi jednotlivými složkami a další parametry, které napomáhají určit nutriční hodnoty a případně vylepšit složení daných poživatin (Venema 2015).

Z důvodu limitujících faktorů (konstantní pH, koncentrace trávicích enzymů a žlučových kyselin), které zkreslují konečné výsledky, byly vyvinuty dynamické modely. Tyto systémy jsou zkonstruovány tak, aby zajistily dokonalejší simulaci trávení v lidském a zvířecím těle. Existují modely napodobující buď jednu (například žaludek, tenké střevo, tlusté střevo) nebo více částí trávicího traktu (Dupont et al. 2019).

DGM (dynamický model žaludku) je *in vitro* model schopný napodobit biochemické a mechanické procesy, které se uskutečňují během trávení potravy v žaludku. Reakce probíhající v tomto systému trvají stejně dlouho jako v živém organismu (v rozmezí 25 min až 4,5 h), což je velkým benefitem (Venema 2015). V první fázi dochází k promíchání nehomogenní potravy pomocí rytmických kontrakcí, v části označené jako fundus. Kontrakce jsou vyvolány stlačováním vodního pláště, který zvenčí obklopuje fundus. Na hladině směsi je umístěn dávkovač, jež zajišťuje vylučování enzymů a kyselin. Množství uvolňovaných kyselin je závislé na hodnotě pH, které je měřeno pH elektrodou uvnitř fundu. Během druhé fáze dochází k přesunu potravy do části zvané antrum. Antrum se skládá z pístu a barelu, jež svými pohyby zajišťují mechanické rozmělnění potravy, průchod a vyloučení tráveniny přes elastickou membránu (Dupont et al. 2019).

Dle Kong & Singh (2010) v modelu DGM nedochází k správnému napodobení peristaltických pohybů, které probíhají v živém organismu. Proto se rozhodli vytvořit nový systém zvaný HGS (simulátor lidského žaludku). Tento model lépe simuluje proces trávení *in vivo*, protože v něm probíhají více realistické peristaltické kontrakce, sekrece žaludku a vyprazdňování. Základem modelu je latexová nádoba obklopená soustavou válečků, které jsou napojeny k motoru a zajišťují rytmické smršťování (3 kontrakce za minutu). V nádobě je umístěna polyesterová síťovina s oky o velikosti 1,5 mm, kterou prochází malé částice a tím napodobuje efekt vrátníku. Do zmíněné latexové komory je pomocí plastových trubiček dodávána simulovaná žaludeční šťáva (1 g pepsinu, 1,5 g hlenu, 8,775 g NaCl, 1 l destilované vody). Doplnování šťáv zajišťuje peristaltické čerpadlo, u kterého lze nastavit průtok mezi 0,03 a 8,2 ml/min. Celý model je uzavřen v plastové pěnové komoře kvůli vytvoření a udržení správné teploty (37 °C). Uvnitř komory jsou nainstalovány dvě 60 W žárovky, které slouží jako zdroj tepla a termostat, jenž řídí zapnutí a vypnutí žárovek.

ARCOL (umělé tlusté střevo) je *in vitro* fermentační model simulující procesy tlustého střeva. V tomto modelu jsou zajištěny stejné podmínky prostředí a probíhající děje jako v tlustém střevě (pH, teplota, anaerobióza, pasivní vstřebávání látek, přítomnost mikrobioty a další). V první fázi dochází k suspendování vzorků stolice zdravých dobrovolníků nebo zvířat do fosfátového pufru, přefiltrování přes dvojistou vrstvu gázy a následně se filtrát naočkuje do fermentoru. Do ARCOL bioreaktoru je průběžně přidáváno kultivační médium, jež napodobuje chemické složení střevních tekutin (karbohydráty, proteiny, lipidy, minerální látky, vitaminy), zatímco fermentační médium je průběžně odebíráno. Konstantní hodnoty pH

a teploty jsou udržovány, díky přidávání NaOH (hydroxidu sodného) a zahřívání dvojité vodní vrstvy. V modelu je přítomný dialyzační systém (membrány z dutých vláken), který má na starosti zachovávat vhodné koncentrace elektrolytů a metabolitů, ale také celkový provozní objem (Dupont et al. 2019).

Zástupcem složitějších dynamických systémů je TNO gastrointestinální model TIM-1, což je *in vitro* model napodobující část lidského gastrointestinálního traktu (žaludek, dvanáctník, lačnick, kyčelník). Systém se skládá ze čtyř paralelně zapojených kompartmentů, které mají skleněný vnější obal a vnitřní flexibilní membránu. Do prostoru mezi skleněnou a pružnou vrstvou je v pravidelných intervalech vháněna voda (37 °C). Proudění teplé vody zajišťuje simulaci peristaltických pohybů gastrointestinálního traktu, ale také udržuje správnou vnitřní teplotu (Cordonnier et al. 2015). V žaludečním kompartmentu je hodnota pH řízená přidáváním kyseliny chlorovodíkové a ve zbylých částech hydrogenuhličitánem sodným. Všechny čtyři části jsou propojeny uzavíratelnými ventily, jež řídí průchod tráveniny. Lačnick a kyčelník mají navíc připojení na filtrační moduly, přes které prochází voda a malé molekuly (Brouwers et al. 2011). Sekrece žaludečních šťáv, žluči a pankreatických šťáv do příslušných kompartmentů je zajištěna počítačem řízenými čerpadly (Cordonnier et al. 2015).

SHIME (simulátor lidského intestinálního mikrobiálního ekosystému) je počítačem řízený model, který slouží k napodobení fyziologie a mikrobiálního prostředí v gastrointestinálním traktu. Skládá se z 5 částí: žaludku, tenkého střeva, vzestupného, příčného a sestupného tračnicku. K prvním dvěma segmentům jsou připojeny trubičky, které zajišťují přívod určeného množství daných tekutin. Do žaludku je doplňován pepsin a nutriční médium, naopak do tenkého střeva vede přívod s pankreatickými enzymy a žlučí. U posledních tří částí modelu je za stálého míchání regulováno pH a objem podle *in vivo* podmínek trávicího traktu. Kompartmenty představující části tlustého střeva se naočkují fekální mikrobiotou, která se za nějaký čas stabilizuje, ale složení a funkčnost mikrobioty je ve vzestupném, příčném a sestupném tračnicku odlišná (Dupont et al. 2019).

Simgi (simulátor gastrointestinálního traktu) je dynamický systém složený z 5 propojených částí, které napodobují činnosti žaludku, tenkého střeva a tlustého střeva (vzestupný, příčný a sestupný tračnick). Žaludeční kompartment se skládá ze dvou tuhých, plastových modulů, jež obklopují silikonový reservoár, v němž probíhá mixování potravy. Do prostoru mezi plastovou a silikonovou částí proudí voda (37 °C) pod měnícím se tlakem, což vytváří peristaltické pohyby. Kyselina chlorovodíková, žaludeční šťáva a zkoumaná potravina je do žaludku přiváděna dvěma postranními otvory. Oddíl tenkého střeva se skládá ze skleněné nádoby s dvojitou stěnou, do níž je za stálého míchání přiváděna pankreatická šťáva, soli a směs ze žaludku. Proces trávení v tenkém střevě probíhá 2 hodiny (při 37 °C, pH 6,8) (Venema 2015). Po proběhlé reakci v tenkém střevě je obsah tenkého střeva odveden do první části tlustého střeva (vzestupného tračnicku). Všechny 3 oddíly tlustého střeva mají stejnou skleněnou stavbu jako má tenké střevo. Do každé části tlustého střeva vede přívod s NaOH a HCl, jež udržují stálou hodnotu pH. Simgi je řízen pomocí počítačového programu Unitronics Vision 120TM, který shromažďuje data (teplota, načerpané objemy, pH) během celého procesu (Dupont et al. 2019).

ESIN (systém žaludku a tenkého střeva) představuje stavebně obsáhlý model, který simuluje část gastrointestinálního traktu. Skládá se z 6 částí: zásobníku na jídlo, ampule na sliny, žaludku, dvanáctníku, lačnicku a kyčelníku. U tohoto *in vitro* modelu není zapotřebí,

aby byla potrava zhomogenizovaná před vstupem do žaludku. Testovaný vzorek přechází ze zásobníku na jídlo přes ampuli se slinami, kde dochází k promíchání potravy se slinami, do žaludku (Guerra et al. 2016). U ESIN je žaludek vytvořený tak, aby napodoboval dvoufázové vyprazdňování, jako tomu je v případě *in vivo*. Uvnitř žaludku jsou přítomné 2 komory a odsazení, které umožňuje rozdělení malých (< 2 mm) a velkých částic (> 2 mm). Zatímco malé částice a tekutý podíl se dostávají do druhé komory, velké částice zůstávají v hlavní komoře, kde podléhají degradaci. V obou komorách se nacházejí otvory napojené na peristaltické čerpadlo, pomocí kterých jsou odváděny pevné a tekuté složky do částí tenkého střeva (Dupont et al. 2019).

Z příkladů výše je zřejmé, že dynamické *in vitro* modely jsou schopné napodobovat trávicí procesy probíhající v lidském těle. Avšak stále existují mechanismy, které by mohly být v budoucnu doplněny do stávajících modelů nebo vylepšeny (správná peristaltika, zajištění mikrobioty v distálních částech tenkého střeva, lepší vstřebávání vody a metabolitů ve střevech) (Dupont et al. 2019).

4 Materiál a metodika

4.1 *In vitro* fekální fermentační systém

4.1.1 Chemikálie

Chemikálie na přípravu fermentačního média NH_4HCO_3 (hydrogenuhličitan amonný), NaHCO_3 (hydrogenuhličitan sodný), Na_2HPO_4 (hydrogenfosforečnan sodný), KH_2PO_4 (dihydrogenfosforečnan draselný), MgSO_4 (síran hořečnatý), CaCl_2 (chlorid vápenatý), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (tetrahydrát chloridu manganatého), $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (hexahdrát chloridu kobaltnatého), FeCl_3 (chlorid železitý), trypton, glukóza, maltóza, kvasnicový extrakt, vitamin K_1 , hemin a resazurin byly získány z Merck (Darmstadt, Germany). Mezi další chemikálie, které byly použity během výzkumu, patří cystein hydrochlorid, 1M NaOH (hydroxid sodný), $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$ (nonahdrát síranu sodného), 6M HCl (kyselina chlorovodíková), NaN_3 (azid sodný), $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ (dimetylsulfoxid), zásobní roztok resveratrolu a plynný dusík.

4.1.2 Fermentační médium

Fermentační médium bylo připraveno z 2,25 g tryptonu, 2,25 g glukózy, 1,125 g maltózy, 2,25 g kvasnicového extraktu, 50,7 μl vitamínu K_1 (0,5 mg/l metanolu), 5,07 mg heminu (tyto látky byly rozpuštěny ve 450 ml destilované vody), 225 ml uhličitanového pufru (4 g NH_4HCO_3 , 35 g NaHCO_3 , 1 l destilované vody), 112,5 μl mikrominerálního roztoku (2,5 g CaCl_2 , 2,5 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 1,25 g FeCl_3 , 25 ml destilované vody), 225 ml makrominerálního roztoku (5,7 g Na_2HPO_4 , 6,2 g KH_2PO_4 , 0,3 g MgSO_4 , 1 l destilované vody) a 1,125 ml 0,1% resazurinového roztoku.

4.1.3 Příprava 96-jamkových deep-well destiček

Fermentační medium bylo zahřáto na 100 °C po dobu 7 minut a následně schlazeno na 37 °C za současného přístupu plynného dusíku. Pomocí 6M HCl bylo upraveno pH na hodnotu 7. Do 96-jamkových deep-well destiček bylo napipetováno 835 μl fermentačního média a 40 μl redukčního roztoku. Takto připravené destičky byly uchovány při 4 °C v anaerobní atmosféře do druhého dne.

4.1.4 Fosfátový pufr, redukční roztok

Fosfátový pufr, který se používá pro přípravu roztoku ze vzorků stolice, byl vytvořen smícháním 390 ml 1/15M KH_2PO_4 a 610 ml 1/15M Na_2PO_4 (pH 7). Redukční roztok byl připraven z 312,5 mg cystein hydrochloridu, 2 ml 1M NaOH, 101,5 mg $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$ a 50 ml destilované vody.

4.1.5 Příprava vzorků stolice

K analýze byly využity vzorky stolice, které byly odebrány od 2 dárců bez dietních omezení, užívání antibiotik a trávicích potíží. K odebraným vzorkům byly přidány anaerogenní sáčky a stolici bylo nutné zpracovat maximálně do 2 hodin. Všechny vzorky byly získány na České zemědělské univerzitě v Praze nebo v jejím okolí. Smícháním 24 g vzorku a 75 ml fosfátového pufru byla připravena 32% suspenze. Následně byla suspenze zhomogenizována ve stomacheru a nakonec byla přefiltrována přes nylonový filtr.

4.1.6 Příprava roztoku resveratrolu

Zásobní roztok resveratrolu o koncentraci 10 mg/ml byl připraven rozpuštěním v DMSO (dimethylsulfoxid). Pracovní roztok byl vytvořen v den experimentu rozpuštěním 500 μ l zásobního roztoku resveratrolu v 2000 μ l fermentačního média. Koncentrace resveratrolu v pracovním roztoku odpovídala 2 mg/ml.

4.1.7 Proces fermentace

Destičky připravené z předchozího dne byly přemístěny na horizontální třepačku do inkubátoru (37 °C). Do destiček bylo přidáno 100 μ l fekální suspenze (do kontroly byl přidán pouze fosfátový pufr), 25 μ l roztoku resveratrolu (finální koncentrace 50 μ g/ml). Následně byly destičky zavakuovány a umístěny do inkubátoru (37 °C, 100 rpm). V časech 0, 2, 4, 8 a 24 hodin bylo do 1,5 ml mikroskopických Eppendorf z každé jamky odebráno 950 μ l vzorku a smíšeno s 50 μ l azidu sodného (finální koncentrace NaN_3 ve vzorcích byla 1,5 mg/ml), aby došlo k rychlému zastavení procesu fermentace. Takto připravené vzorky byly skladovány při -80 °C až do konečné analýzy.

4.1.8 Příprava vzorku pro NMR analýzu

Vzorky byly rozmrazeny při pokojové teplotě, zhomogenizovány na vortexu a zcentrifugovány (4 °C, 15000 rpm, 10 min), aby byla oddělena pevná a kapalná fáze. Následně bylo odebráno 600 μ l supernatantu vzorku a smíšeno s 66,66 μ l NMR pufru (1.5 M K_2HPO_4 + 1.5 M Na_2HPO_4 , pH 7.4, 0.2 % NaN_3 , 5 mM kyselina trimethylsilylpropanová - TSP) v mikroskopických Eppendorf. Takto připravené vzorky zcentrifugovány (4 °C, 15000 rpm, 5 min). Z odstředěných vzorků bylo převedeno 600 μ l do NMR kyvet.

4.1.9 NMR analýza

Spektra byla změřena na spektrometru Bruker Avance III s vybaveném broadband observation sondou (BBFO) SmartProbe s gradienty v ose Z (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Německo) pracující při protonové frekvenci 500,23 MHz. Teplota měření byla 298 K (25 °C). ^1H NMR spektra byla získána a zpracována za stejných podmínek. Pro potlačení signálu vody byla použita pulzní sekvence noesypr1d při 4,704 ppm. Pro každý vzorek byl použit jednodimenzionální ^1H experiment s následujícími parametry: počet skenů NS 128, počet datových bodů 32k při šířce spectra 16 ppm, relaxační prodleva 1 s, akviziční čas 4 s, směšovací čas 0,1 s. Ladění přístroje, kalibrace 90° pulzu a šimování byly

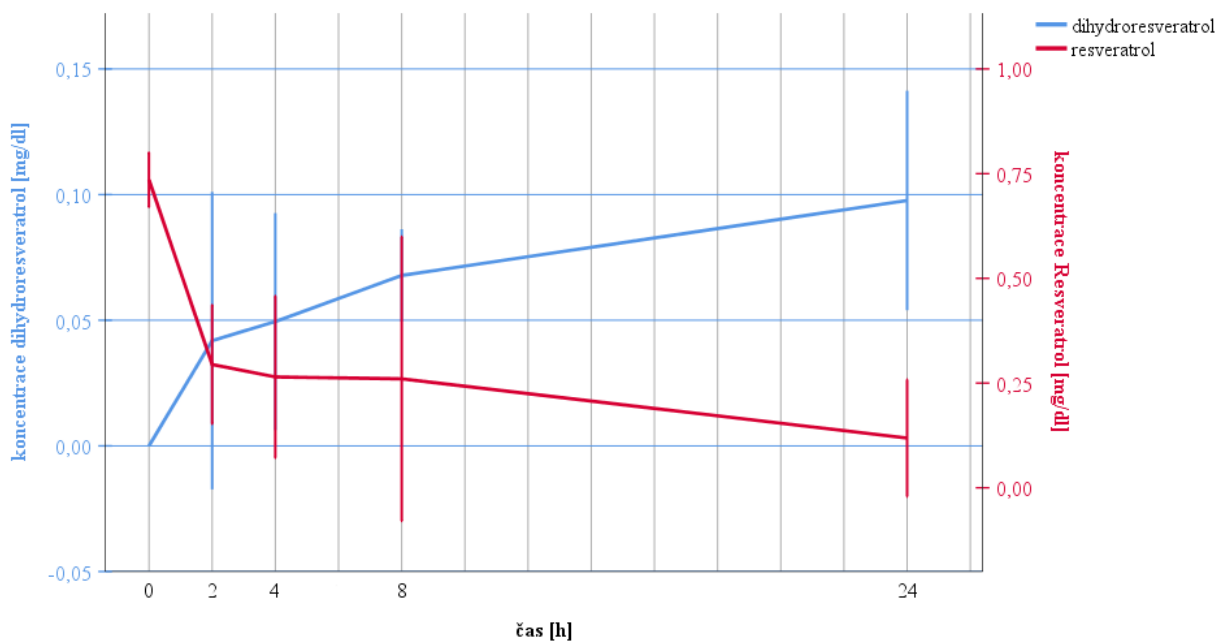
optimalizovány automaticky pomocí standardních automatických rutin (atma, lock, rga, pulsecal a topshim). Signál volné precese (FID) byl před Fourierovou transformací zpracována zero filling, line broadening 0,3 Hz a exponenciální multiplikací. Spektra byla manuálně fázována a referencována na TSP 0.00 ppm v programu Topspin. Alignment a export spekter byl proveden v programu Mestrenova, anotace látek a kvantifikace v programu Chenomx 8.5.

4.1.10 Statistická analýza

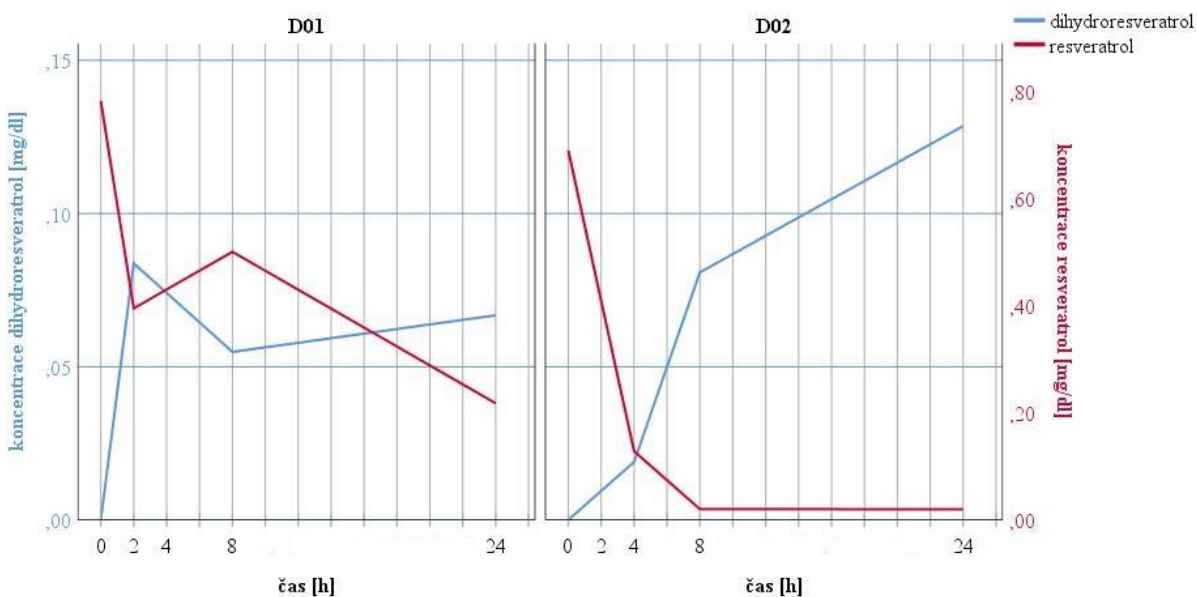
Statistická analýza byla provedena v programech Microsoft Excel a IBM SPSS Statistics 25. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm směrodatná odchylka.

5 Výsledky

Naměřená data z *in vitro* fermentace v 96-jamkových deep-well destičkách, byla využita k pozorování průběhu metabolické transformace resveratrolu. Z výsledků bylo zjištěno, že hlavním a zároveň jediným metabolitem resveratrolu byl u obou našich dárců dihydroresveratrol. Na obrázku číslo 14 je znázorněna závislost průměru hodnot koncentrace resveratrolu a dihydroresveratrolu na čase. Je zřejmé, že koncentrace resveratrolu v čase klesala, zatímco koncentrace dihydroresveratrolu v čase rostla.



Obrázek 14 Graf závislosti průměrné koncentrace resveratrolu a dihydroresveratrolu na čase. Data jsou vyjádřena jako průměr ná koncentrace \pm směrodatná odchylka, N=2.



Obrázek 15 Graf závislosti resveratrolu a dihydroresveratrolu na čase

U všech dárců byla podle NMR spektra ze strukturní databáze látek hledána i sloučenina lunularinu, avšak ani u jednoho dárce nebyla tato látka nalezena.

Na obrázku číslo 15 můžeme vidět, že změny koncentrace resveratrolu se během fermentace u dárců liší a největší pokles nastává od 2 a 8 hodiny. U dárce číslo 2 došlo v 8 hodině fermentace k poklesu resveratrolu téměř na nulovou koncentraci, zatímco u dárce číslo 1 se resveratrol i po 24 hodinách vyskytoval ve vyšší koncentraci.

6 Diskuze

Výsledky této bakalářské práce potvrzují stanovenou hypotézu, že resveratrol je metabolizován pomocí střevní mikrobioty na další sloučeniny. Výzkum se však zabývá hlavně vznikem, hledáním a pojmenováním jednotlivých metabolitů, což může pomoci k rozšíření dosavadních informací o metabolismu resveratrolu. Znalost průběhu metabolismu a vzniklých metabolitů je důležitá především proto, že resveratrol, ale i jiné polyfenoly, jsou intenzivně metabolizovány během Fáze I a Fáze II v orgánech (játra, tenké střevo, tlusté střevo) i tkáních. Pro tento experiment byly nově využity 96-jamkové deep-well destičky, které by mohly být vhodnou alternativou pro fermentace ve skleněných víálkách.

Jediným metabolitem resveratrolu, který vznikl a byl nalezen u obou dárců mého experimentu, je dihydroresveratrol. Tento metabolit se shoduje s výsledky z ostatních *in vitro* a *in vivo* studií (Aminnezhad et al. 2016a, 2016b; Jarosova et al. 2019). Tímto výzkumem bylo potvrzeno, že dihydroresveratrol patří mezi hlavní a nejčastější produkt metabolismu resveratrolu, jenž vznikl působením střevní mikrobioty. Koncentrace resveratrolu v průběhu fermentace klesla již po 8 hodinách pouze u jednoho z dárců téměř na nulovou koncentraci. V experimentu, který provedli Bode et al. 2013, se u dárců rovněž vyskytují rozdíly v rozkladu resveratrolu. U některých vzorků byl resveratrol zcela rozložen již po 2 hodinách, u dalších po 6, 8 nebo 24 hodinách. Nicméně ve výzkumu od Bode et al. 2013 byly kromě dihydroresveratrolu nalezeny další dva metabolity, kterými jsou lunularin a *trans*-3,4'-dihydroxystilben. Zatímco *trans*-3,4'-dihydroxystilben se vyskytoval v malých koncentracích, lunularin byl detekován ve větším množství podobně jako dihydroresveratrol. Z tohoto důvodu bylo mou snahou najít kromě dihydroresveratrolu i lunularin,

Bode et al. 2013 využili odlišnou metodu, která se lišila využitím skleněných viálek pro fermentaci, analýza vzorků nekončila v čase 24 hodin, ale v čase 48 hodin a měření bylo provedeno pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem a fotometrickými detektory. NMR spektroskopie byla také využita, ale pouze pro analýzu *trans*-3,4'-dihydroxystilbenu a lunularinu, nikoliv pro identifikaci dihydroresveratrolu. V mém výzkumu byla rovněž pro identifikaci lunularinu využita NMR spektroskopie a templát spektra, podle kterého byl lunularin hledán, jsem získala z výsledku měření standardu, jenž jsem měla k dispozici od německé laboratoře (Ludwig-Maximilians-Universität München). Nicméně přítomnost lunularinu nebyla ani u jednoho z mých vzorků prokázána. Důvodem může být rozdílné složení mikrobioty jednotlivých dárců. Jako další příčina, proč jsem lunularin v mých vzorcích nenašla, by mohla být odlišnost ve způsobu fermentace, protože jsem nově využívala 96-jamkové deep-well destičky.

Ve výsledcích z výzkumu Jarosova et al. 2019, byl stejně jako v mém případě uveden jako metabolit pouze dihydroresveratrol. Těchto výsledků bylo dosaženo i přesto, že fermentace probíhala ve skleněných víálkách po dobu 48 hodin a k měření byla využita kapalinová chromatografie. Toto zjištění vylučuje, že by vznik metabolitů mohl být ovlivněn novou metodou fermentace v 96-jamkových deep-well destičkách a zároveň potvrzuje její funkčnost i spolehlivost. V této studii je však zmíněna odlišnost hodnot konečných koncentrací resveratrolu a dihydroresveratrolu u jednotlivých dárců, což se shoduje s našimi výsledky. Tento fakt dosvědčuje to, že metabolismus resveratrolu probíhá u každého jedince odlišně. Může to být zapříčiněno právě tím, že složení střevní mikrobioty a její míra působení

na chemické látky se u každého člověka liší. Ovšem tato příčina by potřebovala další objasnění, například v podobě identifikace jednotlivých rodů střevních bakterií u všech získaných vzorků. V mé studii se vyskytují mnohem nižší koncentrace resveratrolu i dihydroresveratrolu, jak na začátku průběhu fermentace, tak na konci. Důvodem by mohla být odlišná metoda fermentace a jiné složení fermentačního média, protože v mém případě byl obsah fermentačního média obohacen glukózou, maltózou, kvasnicovým extraktem, vitamínem K₁ a heminem.

Bode et al. 2013 provedli určení bakterií, které měly pravděpodobně vliv na tvorbu lunularinu. Dárci, u kterých se vyskytoval pouze dihydroresveratrol, jako v případě mého výzkumu, měli vyšší výskyt bakterií z kmene Firmicutes, menší výskyt Bacteroidetes, Actinobacteria (především Bifidobacteriaceae a Coriobacteriaceae), Verrucomicrobia, Cyanobacteria a Enterobacteriaceae ve srovnání se vzorky, kde vznikal lunularin. Dalo by se předpokládat, že dárci z mého experimentu měli hodně podobné složení střevní mikrobioty, jako je uvedeno výše a z tohoto důvodu nebylo možné lunularin najít. Jaimes et al. 2019 se také zabývali vztahem mezi střevní mikrobiotou a resveratrolem. *Trans*-resveratrol byl ponechán 24 hodin se vzorky stolice v *in vitro* fekálním fermentačním systému a následně bylo identifikováno složení střevní mikrobioty pomocí 16S rRNA sekvenační analýzy. Mezi kmeny bakterií, které se vyskytovaly nejhojněji patří Actinobacteria, Firmicutes a Proteobacteria (čeleď Enterobacteriaceae). Tyto kmeny se shodují s výsledky, které byly publikovány ve studii od Bode et al. 2013.

Jung et al. 2009 zkoumali metabolismus resveratrolu podobnou metodou jako byla použita v této bakalářské práci, avšak jejich zaměření bylo i na vliv resveratrolu na jednotlivé bakterie. Výsledky této studie potvrzují mou hypotézu, že je resveratrol transformován za účasti bakterií na dihydroresveratrol, jehož struktura byla potvrzena pomocí NMR analýzy i kapalinové chromatografie. Nicméně ani v tomto případě lunularin nevznikal a tím pádem nemohl být nalezen. Podle dostupných informací je tato studie nejspíše jedinou, při které byly podobným způsobem jako v mém výzkumu využity 96-jamkové deep-well destičky, avšak s kombinací se skleněnými víálkami. Tato studie potvrzuje, že složení bakterií má významný vliv na přeměnu resveratrolu. Byly zjištěny 2 anaerobní bakterie (*Eggerthella lenta* a *Bacteroides uniformis*), které se přímo podílí na vzniku dihydroresveratrolu. *E. lenta* a *B. uniformis* jsou možným důvodem, proč v našich vzorcích nevznikl lunularin, ale pouze dihydroresveratrol.

V budoucích letech by mohlo být přínosné, kdyby od každého dárce byly s časovým rozestupem odebrány alespoň dva vzorky, jako to bylo provedeno v případě výzkumu Bode et al. 2013. Výsledky by následně bylo možné porovnat a případně by se dalo zjistit, zda v laboratorním výzkumu nedošlo k chybě, eventuálně kde. Tím, že se ve většině mých vzorků po 24 hodinách resveratrol stále v menším množství nacházel, je možné, že by se při delším intervalu fermentace mohl dále rozkládat. Ovšem ve výzkumu od Jarosova et al. 2019 bylo zjištěno, že se resveratrol u některých dárců vyskytuje v poměrně vysokých koncentracích i po 48 hodinách. Tyto výsledky poukazují na to, že se resveratrol rozložit nemusí a může zůstat v původní formě, proto má hypotéza nemusí být pravdivá, ale potřebovala by další objasnění.

V této bakalářské práci bylo prokázáno, že nová metoda fermentace v 96-jamkových deep-well destičkách je účinná a výsledky jsou srovnatelné s modely využívajícími skleněné víálky. Bylo potvrzeno, že resveratrol je mikrobiálně transformován na další látky, což se

shoduje s dřívějšími výsledky. Ve srovnání s výzkumy, které byly provedeny v minulosti, byl nalezen pouze jeden metabolit, ale s celkovou hypotézou se výzkumy shodují. V mém výzkumu bylo zjištěno, že metabolismus resveratrolu i jeho rychlost se u každého člověka liší, to mohlo být zapříčiněno složením mikrobioty a současně rozdílným trávením. Z tohoto důvodu by bylo dobré, kdyby se budoucí výzkum zaměřil na srovnání metabolismu resveratrolu i dalších fenolových sloučenin u většího množství dárců.

7 Závěr

Transformace polyfenolů při průchodu trávicím traktem hraje významnou roli pro jejich biodostupnost a bioefekt. V této práci byl sledován metabolismus resveratrolu, významného stilbenoidu, v *in vitro* modelu tlustého střeva. Prvním cílem bylo identifikovat jednotlivé metabolity resveratrolu, které vznikají mikrobiální transformací v tlustém střevě. V tomto experimentu bylo potvrzeno, že resveratrol je metabolizován střevní mikrobiotou za vzniku dalších látek. Výsledky ukázali, že střevní bakterie v obou vzorcích metabolizovali resveratrol na dihydroresveratrol. Tento metabolit pravděpodobně vznikl hydrogenací dvojné vazby etylenového můstku, jenž je za normálních okolností přítomna v chemické struktuře resveratrolu i jiných stilbenoidů. Dihydroresveratrol byl jediným metabolitem detekovaným v tomto modelu.

Dalším cílem této bakalářské práce bylo ověření nové metody využívající 96-jamkové deep-well destičky, která je ve srovnání s klasickou metodou ve skleněných víčkách rychlejší, jednodušší a umožňuje získání většího množství vzorků a opakování. Bakalářská práce ukazuje, že tato nová metoda fermentace je funkční i spolehlivá k využití během dalších výzkumů.

Hypotéza této bakalářské práce, že resveratrol bude mikrobiálně transformován mikrobiotou tlustého střeva na nové metabolity, byla tedy potvrzena a splněny byly také všechny cíle práce.

8 Literatura

- Ahn J, Yang L, Paster BJ, Ganly I, Morris L, Pei Z, Hayes RB. 2011. Oral Microbiome Profiles: 16S rRNA Pyrosequencing and Microarray Assay Comparison. *PLoS ONE* **6**:e22788. Dostupné z <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0022788>.
- Akinwumi B, Bordun K-A, Anderson H. 2018. Biological Activities of Stilbenoids. *International Journal of Molecular Sciences* **19**:792. Dostupné z <http://www.mdpi.com/1422-0067/19/3/792>.
- Aminnezhad S, Kermanshahi RK, Ranjbar R. 2016a. Effect of althaea officinalis extract on growth and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Pure and Applied Microbiology* **10**:1857–1863. Dostupné z https://www.researchgate.net/publication/309261625_Effect_of_althaea_officinalis_extract_on_growth_and_biofilm_formation_in_Pseudomonas_aeruginosa.
- Aminnezhad S, Kermanshahi RK, Ranjbar R. 2016b. Effect of althaea officinalis extract on growth and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* **10**:1857–1863.
- Anekonda TS. 2006. Resveratrol—A boon for treating Alzheimer’s disease? *Brain Research Reviews* **52**:316–326. Dostupné z <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165017306000178>.
- Ashford M. 2017. Biopharmaceutical principles of drug delivery. Strany 296–313 in M. A. Alton a K. M. G. Taylor, editoři. *Aulton’s Pharmaceutics E-Book: The Design and Manufacture of Medicines*, 5. vydání. Elsevier, London.
- Barreca D, Gattuso G, Bellocco E, Calderaro A, Trombetta D, Smeriglio A, Laganà G, Daglia M, Meneghini S, Nabavi SM. 2017. Flavanones: Citrus phytochemical with health-promoting properties. *BioFactors* **43**:495–506. Dostupné z <http://doi.wiley.com/10.1002/biof.1363>.
- Belščak-Cvitanović A, Durgo K, Huđek A, Bačun-Družina V, Komes D. 2018. Overview of polyphenols and their properties. Strany 3–44 *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*. Elsevier. Dostupné z <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128135723000014>.
- Bhunia AK. 2018. *Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis*, 2. vydání. Springer New York, New York, NY. Dostupné z <http://www.springernature.com/series/5999>.
- Bird JK, Raederstorff D, Weber P, Steinert RE. 2017. Cardiovascular and Antiobesity Effects of Resveratrol Mediated through the Gut Microbiota. *Advances in Nutrition: An International Review Journal* **8**:839–849. Dostupné z <http://advances.nutrition.org/lookup/doi/10.3945/an.117.016568>.
- Bliven K, Lampel KA. 2017. *Shigella*. *Strana Foodborne Diseases Third Edit*. Elsevier Inc. Dostupné z <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123850072000061>.
- Bode LM, Bunzel D, Huch M, Cho G-S, Ruhland D, Bunzel M, Bub A, Franz CM, Kulling SE. 2013. In vivo and in vitro metabolism of trans-resveratrol by human gut microbiota. *The American Journal of Clinical Nutrition* **97**:295–309. Dostupné z <https://academic.oup.com/ajcn/article/97/2/295/4577012>.
- Brooks A. 2006. Digestive system. Strany 31–47 in C. Chowk, editor. *Systems of our body*, 1. vydání. Global Media, Delhi. Dostupné z <https://ebookcentral-proquest-com.infozdroje.czu.cz/lib/czup/detail.action?docID=3011080>.
- Brouwers J, Anneveld B, Goudappel G-J, Duchateau G, Annaert P, Augustijns P, Zeijdner E. 2011. Food-dependent disintegration of immediate release fosamprenavir tablets: In vitro evaluation using magnetic resonance imaging and a dynamic gastrointestinal system. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **77**:313–319. Elsevier B.V. Dostupné z <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939641110002833>.

- Campbell J, Berry J, Liang Y. 2019. Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract Anatomy and Physiology of the Small Intestine. Strany 817–841 in C. J. Yeo, editor. Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract, 8. vydání. Elsevier, Philadelphia.
- Cardona F, Andrés-Lacueva C, Tulipani S, Tinahones FJ, Queipo-Ortuño MI. 2013. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **24**:1415–1422. Elsevier Inc. Dostupné z <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955286313000946>.
- Chan MM-Y. 2002. Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin. *Biochemical Pharmacology* **63**:99–104. Dostupné z <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006295201008863>.
- Chen W, Yeo SCM, Elhennawy MGAA, Lin H-S. 2016. Oxyresveratrol: A bioavailable dietary polyphenol. *Journal of Functional Foods* **22**:122–131. Elsevier Ltd. Dostupné z <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464616000232>.
- Cordonnier C, Thévenot J, Etienne-Mesmin L, Denis S, Alric M, Livrelli V, Blanquet-Diot S. 2015. Dynamic In Vitro Models of the Human Gastrointestinal Tract as Relevant Tools to Assess the Survival of Probiotic Strains and Their Interactions with Gut Microbiota. *Microorganisms* **3**:725–745. Dostupné z <http://www.mdpi.com/2076-2607/3/4/725>.
- Cosby K et al. 2003. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nature Medicine* **9**:1498–1505. Dostupné z <http://www.nature.com/articles/nm954>.
- Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. 2006. Phenols, Polyphenols and Tannins: An Overview. Strany 1–24 in A. Crozier, M. N. Clifford, a H. Ashihara, editoři. *Plant Secondary Metabolites*, 1. vydání. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK. Dostupné z <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470988558.ch1>.
- Cueva C, Gil-Sánchez I, Moreno-Arribas MV, Bartolomé B. 2016. Interactions Between Wine Polyphenols and Gut Microbiota. Strany 259–278 *Wine Safety, Consumer Preference, and Human Health*. Springer International Publishing, Cham. Dostupné z http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-24514-0_13.
- Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JPE, Tognolini M, Borges G, Crozier A. 2013. Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling* **18**:1818–1892. Dostupné z <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ars.2012.4581>.
- Dietrich CG. 2003. ABC of oral bioavailability: transporters as gatekeepers in the gut. *Gut* **52**:1788–1795. Dostupné z <http://gut.bmj.com/cgi/doi/10.1136/gut.52.12.1788>.
- Docherty JJ, Fu MM, Tsai M. 2001. Resveratrol selectively inhibits *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **47**:243–244. Dostupné z <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/47.2.243>.
- Docherty JJ, McEwen HA, Sweet TJ, Bailey E, Booth TD. 2007. Resveratrol inhibition of *Propionibacterium acnes*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **59**:1182–1184. Dostupné z <http://academic.oup.com/jac/article/59/6/1182/714335/Resveratrol-inhibition-of-Propionibacterium-acnes>.
- Doré S. 2005. Unique Properties of Polyphenol Stilbenes in the Brain: More than Direct Antioxidant Actions; Gene/Protein Regulatory Activity. *Neurosignals* **14**:61–70. Dostupné z <https://www.karger.com/Article/FullText/85386>.
- Duda-Chodak A. 2012. The Inhibitory Effect of Polyphenols on Human Gut Microbiota. *Journal of Physiology and Pharmacology*:497–503. Dostupné z https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/36004236/JPP_2012.pdf?1418995788=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DTHE_INHIBITORY_EFFECT_OF_POLYPHENOLS_ON.pdf&Expires=1593428787&Signature=H8dL6oGGApLTxO7DhfLJXxLFVN

ojEbbITxMJ8Gf26tFild5TV1rJdgzsZISu.

- Duda-Chodak A, Tarko T, Satora P, Sroka P. 2015. Interaction of dietary compounds, especially polyphenols, with the intestinal microbiota: a review. *European Journal of Nutrition* **54**:325–341. Dostupné z <http://link.springer.com/10.1007/s00394-015-0852-y>.
- Dupont D et al. 2019. Can dynamic in vitro digestion systems mimic the physiological reality? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **59**:1546–1562. Taylor & Francis. Dostupné z http://eprints.whiterose.ac.uk/135229/1/Infogest_correlation_vivo-vitro_dynamic_26072016_vf.pdf.
- Dvorakova M, Landa P. 2017. Anti-inflammatory activity of natural stilbenoids: A review. *Pharmacological Research* **124**:126–145. Elsevier Ltd. Dostupné z <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043661817308708>.
- El Aidy S, van den Bogert B, Kleerebezem M. 2015. The small intestine microbiota, nutritional modulation and relevance for health. *Current Opinion in Biotechnology* **32**:14–20. Elsevier Ltd. Dostupné z <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166914001657>.
- El Khawand T, Courtois A, Valls J, Richard T, Krisa S. 2018. A review of dietary stilbenes: sources and bioavailability. *Phytochemistry Reviews* **17**:1007–1029. Dostupné z <http://link.springer.com/10.1007/s11101-018-9578-9>.
- Eng S-K, Pusparajah P, Ab Mutalib N-S, Ser H-L, Chan K-G, Lee L-H. 2015. Salmonella : A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science* **8**:284–293. Dostupné z <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21553769.2015.1051243>.
- Etcheberria U, Fernández-Quintela A, Milagro FI, Aguirre L, Martínez JA, Portillo MP. 2013. Impact of Polyphenols and Polyphenol-Rich Dietary Sources on Gut Microbiota Composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**:9517–9533. Dostupné z <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf402506c>.
- Fogliano V, Corollaro ML, Vitaglione P, Napolitano A, Ferracane R, Travaglia F, Arlorio M, Costabile A, Klinder A, Gibson G. 2011. In vitro bioaccessibility and gut biotransformation of polyphenols present in the water-insoluble cocoa fraction. *Molecular Nutrition & Food Research* **55**:S44–S55. Dostupné z <http://doi.wiley.com/10.1002/mnfr.201000360>.
- Gambini J et al. 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**:1–13. Dostupné z <http://www.hindawi.com/journals/omcl/2015/837042/>.
- Gao S, Hu M. 2010. Bioavailability Challenges Associated with Development of Anti-Cancer Phenolics. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **10**:550–567. Dostupné z <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-5575&volume=10&issue=6&spage=550>.
- Gibson GG, Skett P. 1986. *Introduction to Drug Metabolism*. Springer US, Boston, MA. Dostupné z https://books.google.cz/books?hl=en&lr=&id=apAkBAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP8&dq=Introduction+to+Drug+Metabolism+&ots=rNaR7yXOjh&sig=nJXVBE78yCcVdGZO1iq1eJQ2ug&redir_esc=y#v=onepage&q=Phase&f=false (viděno červen 29, 2020).
- Greenwood-Van Meerveld B, Johnson AC, Grundy D. 2017. Gastrointestinal Physiology and Function. Strany 1–16 in B. Greenwood-Van Meerveld, editor. Springer International Publishing, Cham. Dostupné z http://link.springer.com/10.1007/164_2016_118.
- Guerra A et al. 2016. Development and validation of a new dynamic computer-controlled model of the human stomach and small intestine. *Biotechnology and Bioengineering* **113**:1325–1335. Dostupné z <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.25890>.

- He J, Li Y, Cao Y, Xue J, Zhou X. 2015. The oral microbiome diversity and its relation to human diseases. *Folia Microbiologica* **60**:69–80. Dostupné z <http://link.springer.com/10.1007/s12223-014-0342-2>.
- Henderson B, Nibali L. (b.r.). *The Human Microbiota and Human Chronic Disease Dysbioses as a Cause of Human Pathology*, 1. vydání. John Wiley & Sons, Incorporated.
- Hodler J, Kubik-Huch RA, von Schulthess GK. 2016. Oral Cavity, Larynx, and Pharynx. Strany 161–167 in J. Hodler, R. A. Kubik-Huch, a G. K. von Schulthess, editoři. *Diseases of the Brain, Head and Neck, Spine 2016-2019: Diagnostic Imaging*, 1. vydání. Springer International Publishing. Dostupné z <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-30081-8>.
- Hostetler GL, Ralston RA, Schwartz SJ. 2017. Flavones: Food Sources, Bioavailability, Metabolism, and Bioactivity. *Advances in Nutrition: An International Review Journal* **8**:423–435. Dostupné z <https://academic.oup.com/advances/article/8/3/423-435/4558050>.
- Hoyles L, Swann J. 2019. Influence of the Human Gut Microbiome on the Metabolic Phenotype. Strany 535–560 *The Handbook of Metabolic Phenotyping*. Elsevier. Dostupné z <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128122938000189>.
- Huang H, Krishnan HB, Pham Q, Yu LL, Wang TTY. 2016. Soy and Gut Microbiota: Interaction and Implication for Human Health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **64**:8695–8709. Dostupné z <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.6b03725>.
- Huang JY, Goers Sweeney E, Guillemin K, Amieva MR. 2017. Multiple Acid Sensors Control *Helicobacter pylori* Colonization of the Stomach. *PLOS Pathogens* **13**:e1006118. Dostupné z <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1006118>.
- Hughes I, Woods HF. 2003. Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment. Strana COT Report-Phytoestrogens and Health. Dostupné z http://www.food.gov.uk/science/ouradvisors/toxicity/COTwg/wg_phyto/ (viděno červen 29, 2020).
- Hur SJ, Lim BO, Decker EA, McClements DJ. 2011. In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry* **125**:1–12. Elsevier Ltd. Dostupné z <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.036>.
- Ishiguro E, Haskey N, Campbell K. 2018. *Gut Microbiota*. Elsevier, London. Dostupné z <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/C20160000724>.
- Jaimes J, Jarosova V, Vesely O, Mekadim C, Mrazek J, Marsik P, Killer J, Smejkal K, Kloucek P, Havlik J. 2019. Effect of Selected Stilbenoids on Human Fecal Microbiota. *Molecules* **24**:744. Dostupné z <http://www.mdpi.com/1420-3049/24/4/744>.
- Jandhyala SM. 2015. Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology* **21**:8787. Dostupné z <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v21/i29/8787.htm>.
- Jang J, Hur H-G, Sadowsky MJ, Byappanahalli MN, Yan T, Ishii S. 2017. Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications-a review. *Journal of Applied Microbiology* **123**:570–581. Dostupné z <http://doi.wiley.com/10.1111/jam.13468>.
- Jarosova V, Vesely O, Marsik P, Jaimes J, Smejkal K, Kloucek P, Havlik J. 2019. Metabolism of Stilbenoids by Human Faecal Microbiota. *Molecules* **24**:1155. Dostupné z <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/6/1155>.
- Jin J-S, Touyama M, Hisada T, Benno Y. 2012. Effects of green tea consumption on human fecal microbiota with special reference to *Bifidobacterium* species. *Microbiology and Immunology* **56**:729–739. Dostupné z <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1348-0421.2012.00502.x>.
- Jung CM, Heinze TM, Schnackenberg LK, Mullis LB, Elkins SA, Elkins CA, Steele RS, Sutherland JB. 2009. Interaction of dietary resveratrol with animal-associated bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **297**:266–273. Dostupné z <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.2009.01691.x>.

- Kamiloglu S, Capanoglu E, Grootaert C, Van Camp J. 2015. Anthocyanin Absorption and Metabolism by Human Intestinal Caco-2 Cells—A Review. *International Journal of Molecular Sciences* **16**:21555–21574. Dostupné z <http://www.mdpi.com/1422-0067/16/9/21555>.
- Kapetanovic IM, Muzzio M, Huang Z, Thompson TN, McCormick DL. 2011. Pharmacokinetics, oral bioavailability, and metabolic profile of resveratrol and its dimethylether analog, pterostilbene, in rats. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **68**:593–601. Dostupné z <http://link.springer.com/10.1007/s00280-010-1525-4>.
- Kapil V et al. 2010. Inorganic Nitrate Supplementation Lowers Blood Pressure in Humans. *Hypertension* **56**:274–281. Dostupné z <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.153536>.
- Kerr AR. 2015. The oral microbiome and cancer. *Journal of dental hygiene : JDH* **89 Suppl 1**:20–3. Dostupné z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25691020>.
- Kilian M, Chapple ILC, Hannig M, Marsh PD, Meuric V, Pedersen AML, Tonetti MS, Wade WG, Zaura E. 2016. The oral microbiome – an update for oral healthcare professionals. *British Dental Journal* **221**:657–666. Dostupné z <http://www.nature.com/articles/sj.bdj.2016.865>.
- Kim D-W, Kim Y-M, Kang S-D, Han Y-M, Pae H-O. 2012. Effects of Resveratrol and trans-3,5,4'-Trimethoxystilbene on Glutamate-Induced Cytotoxicity, Heme Oxygenase-1, and Sirtuin 1 in HT22 Neuronal Cells. *Biomolecules and Therapeutics* **20**:306–312. Dostupné z <http://koreascience.or.kr/journal/view.jsp?kj=OOOMB4&py=2012&vnc=v20n3&sp=306>.
- Kong F, Singh RP. 2010. A Human Gastric Simulator (HGS) to Study Food Digestion in Human Stomach. *Journal of Food Science* **75**:E627–E635. Dostupné z <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3841.2010.01856.x>.
- Kopp P. 1998. Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the „French paradox“? *European Journal of Endocrinology* **138**:619–620. Dostupné z <https://ej.e.bioscientifica.com/view/journals/eje/138/6/619.xml>.
- Kosuru R, Rai U, Prakash S, Singh A, Singh S. 2016. Promising therapeutic potential of pterostilbene and its mechanistic insight based on preclinical evidence. *European Journal of Pharmacology* **789**:229–243. Elsevier. Dostupné z <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014299916304873>.
- Kotloff KL, Riddle MS, Platts-Mills JA, Pavlinac P, Zaidi AKM. 2018. Shigellosis. *The Lancet* **391**:801–812. Dostupné z <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673617332968>.
- Křížová L, Dadáková K, Kašparovská J, Kašparovský T. 2019. Isoflavones. *Molecules* **24**:1076. Dostupné z <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/6/1076>.
- Kverka M, Tlaskalová-Hogenová H. 2017. Intestinal Microbiota: Facts and Fiction. *Digestive Diseases* **35**:139–147.
- Lee HC, Jenner AM, Low CS, Lee YK. 2006. Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Research in Microbiology* **157**:876–884. Dostupné z <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923250806001525>.
- Likhitwitayawuid K, Sritularak B, Benchanak K, Lipipun V, Mathew J, Schinazi RF. 2005. Phenolics with antiviral activity from *Milletia Erythrocalyx* and *Artocarpus Lakoocha*. *Natural Product Research* **19**:177–182. Dostupné z <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14786410410001704813>.
- Mahady GB, Pendland SL. 2000. Resveratrol inhibits the growth of *helicobacter pylori* in vitro. *The American Journal of Gastroenterology* **95**:1849–1849. Dostupné z <http://www.nature.com/doifinder/10.1111/j.1572-0241.2000.02146.x>.

- Mandalari G, Faulks RM, Bisignano C, Waldron KW, Narbad A, Wickham MSJ. 2010. In vitro evaluation of the prebiotic properties of almond skins (*Amygdalus communis* L.). *FEMS Microbiology Letters* **304**:116–122. Dostupné z <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.2010.01898.x>.
- Mazimba O, Majinda RRT, Motlhanka D. 2011. Antioxidant and antibacterial constituents from *Morus nigra*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* **5**:751–754. Dostupné z <http://academicjournals.org/journal/AJPP/article-abstract/499407930439>.
- Minalyan A, Gabrielyan L, Scott D, Jacobs J, Piseigna JR. 2017. The Gastric and Intestinal Microbiome: Role of Proton Pump Inhibitors. *Current Gastroenterology Reports* **19**:42. *Current Gastroenterology Reports*. Dostupné z <http://link.springer.com/10.1007/s11894-017-0577-6>.
- Minekus M et al. 2014. A standardised static in vitro digestion method suitable for food-an international consensus. *Food and Function* **5**:1113–1124.
- Mohn ES, Johnson EJ. 2015. Nutrient absorption in the human gastrointestinal tract. Strany 3–34 *Nanotechnology and Functional Foods*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. Dostupné z <http://doi.wiley.com/10.1002/9781118462157.ch2>.
- Moreno-Indias I, Sánchez-Alcoholado L, Pérez-Martínez P, Andrés-Lacueva C, Cardona F, Tinahones F, Queipo-Ortuño MI. 2016. Red wine polyphenols modulate fecal microbiota and reduce markers of the metabolic syndrome in obese patients. *Food & Function* **7**:1775–1787. Royal Society of Chemistry. Dostupné z <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5FO00886G>.
- Navarro G, Martínez -Pinilla E, Ortiz R, Noé V, Ciudad CJ, Franco R. 2018. Resveratrol and Related Stilbenoids, Nutraceutical/Dietary Complements with Health-Promoting Actions: Industrial Production, Safety, and the Search for Mode of Action. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **17**:808–826. Dostupné z <http://doi.wiley.com/10.1111/1541-4337.12359>.
- Nutakul W, Sobers HS, Qiu P, Dong P, Decker EA, McClements DJ, Xiao H. 2011. Inhibitory Effects of Resveratrol and Pterostilbene on Human Colon Cancer Cells: A Side-by-Side Comparison. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**:10964–10970. Dostupné z <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf202846b>.
- Okubo T, Ishihara N, Takahashi H, Fujisawa T, Kim M, Yamamoto T, Mitsuoka T. 1994. Effects of Partially Hydrolyzed Guar Gum Intake on Human Intestinal Microflora and Its Metabolism. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **58**:1364–1369. Dostupné z <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1271/bbb.58.1364>.
- Ozdal T, Sela DA, Xiao J, Boyacioglu D, Chen F, Capanoglu E. 2016. The Reciprocal Interactions between Polyphenols and Gut Microbiota and Effects on Bioaccessibility. *Nutrients* **8**:78. Dostupné z <http://www.mdpi.com/2072-6643/8/2/78>.
- Pathak S, Kesavan P, Banerjee A, Banerjee A, Celep GS, Bissi L, Marotta F. 2018. Metabolism of Dietary Polyphenols by Human Gut Microbiota and Their Health Benefits. Strany 347–359 *Polyphenols: Mechanisms of Action in Human Health and Disease*, 2. vydání. Elsevier. Dostupné z <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128130063000258>.
- Peate I, Nair M. 2015. *Anatomy and Physiology for Nurse at a Glance*. Strana *Anatomy and Physiology for Nurse at a Glance*, 1. vydání. John Wiley & Sons Inc., Malden, MA.
- Petrovski G, Gurusamy N, Das DK. 2011. Resveratrol in cardiovascular health and disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1215**:22–33. Dostupné z <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.2010.05843.x>.
- Piotrowska H, Kucinska M, Murias M. 2012. Biological activity of piceatannol: Leaving the shadow of resveratrol. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **750**:60–82. Elsevier B.V. Dostupné z <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383574211000974>.

- Povichit N, Phrutivorapongkul A, Suttajit M, Leelapornpisid P. 2010. Antglycation and antioxidant activities of oxyresveratrol extracted from the heartwood of artocarpus lakoocha roxb. *Maejo International Journal of Science and Technology* **4**:454–461. Dostupné z <http://www.mijst.mju.ac.th/vol4/454-461.pdf>.
- Rehfeld A, Nylander M, Karnov K. 2017. *Compendium of Histology*. Strana Compendium of Histology. Springer International Publishing, Cham. Dostupné z <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-41873-5>.
- Reinisalo M, Kårlund A, Koskela A, Kaarniranta K, Karjalainen RO. 2015. Polyphenol Stilbenes: Molecular Mechanisms of Defence against Oxidative Stress and Aging-Related Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2015**:1–24. Dostupné z <http://www.hindawi.com/journals/omcl/2015/340520/>.
- Renaud S, de Lorgeril M. 1992. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet* **339**:1523–1526. Dostupné z <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/014067369291277F>.
- Rimando A, Suh N. 2008. Biological/Chemopreventive Activity of Stilbenes and their Effect on Colon Cancer. *Planta Medica* **74**:1635–1643. Dostupné z <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0028-1088301>.
- Rivière C, Pawlus AD, Mérillon J-M. 2012. Natural stilbenoids: distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in Vitaceae. *Natural Product Reports* **29**:1317. Dostupné z https://www.researchgate.net/profile/Jean-Michel_Merillon/publication/231214356_Natural_stilbenoids_Distribution_in_the_plant_kingdom_and_chemotaxonomic_interest_in_Vitaceae/links/58469f6408ae8e63e62e62b6/Natural-stilbenoids-Distribution-in-the-plant-king.
- Rowland I, Gibson G, Heinken A, Scott K, Swann J, Thiele I, Tuohy K. 2018. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *European journal of nutrition* **57**:1–24. Springer Berlin Heidelberg. Dostupné z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28393285%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5847071>.
- Santhakumar AB, Battino M, Alvarez-Suarez JM. 2018. Dietary polyphenols: Structures, bioavailability and protective effects against atherosclerosis. *Food and Chemical Toxicology* **113**:49–65.
- Schriever C, Pendland SL, Mahady GB. 2003. Red wine, resveratrol, Chlamydia pneumoniae and the French connection. *Atherosclerosis* **171**:379–380. Dostupné z <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021915003003666>.
- Selma M V., Espín JC, Tomás-Barberán FA. 2009. Interaction between phenolics and gut microbiota: Role in human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**:6485–6501.
- Sirerol JA, Rodríguez ML, Mena S, Asensi MA, Estrela JM, Ortega AL. 2016. Role of Natural Stilbenes in the Prevention of Cancer. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2016**:1–15. Dostupné z <http://www.hindawi.com/journals/omcl/2016/3128951/>.
- Smits WK, Lyras D, Lacy DB, Wilcox MH, Kuijper EJ. 2016. Clostridium difficile infection. *Nature Reviews Disease Primers* **2**:16020. Dostupné z <http://www.nature.com/articles/nrdp201620>.
- Springer M, Moco S. 2019. Resveratrol and Its Human Metabolites—Effects on Metabolic Health and Obesity. *Nutrients* **11**:143.
- Thursby E, Juge N. 2017. Introduction to the human gut microbiota. *The Biochemical journal* **474**:1823–1836. Dostupné z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28512250%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5433529>.
- Tomás-Barberán FA, Selma M V., Espín JC. 2016. Interactions of gut microbiota with dietary

- polyphenols and consequences to human health. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* **19**:471–476.
- Tsai H-Y, Ho C-T, Chen Y-K. 2017. Biological actions and molecular effects of resveratrol, pterostilbene, and 3'-hydroxypterostilbene. *Journal of Food and Drug Analysis* **25**:134–147. Elsevier Ltd. Dostupné z <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1021949816300965>.
- Tuohy KM, Scott KP. 2014. The Microbiota of the Human Gastrointestinal Tract: A Molecular View. *Diet-Microbe Interactions in the Gut: Effects on Human Health and Disease*:1–15.
- Uchida-Maruki H, Inagaki H, Ito R, Kurita I, Sai M, Ito T. 2015. Piceatannol lowers the blood glucose level in diabetic mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **38**:629–633.
- Valdes AM, Walter J, Segal E, Spector TD. 2018. Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ* **361**:36–44. Dostupné z <http://www.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmj.j2179>.
- Valdés L, Cuervo A, Salazar N, Ruas-Madiedo P, Gueimonde M, González S. 2015. The relationship between phenolic compounds from diet and microbiota: Impact on human health. *Food and Function* **6**:2424–2439. Royal Society of Chemistry.
- Van'T Hof W, Veerman ECI, Amerongen AVN, Ligtenberg AJM. 2014. Antimicrobial defense systems in saliva. *Monographs in Oral Science* **24**:40–51.
- Van De Wiele TR et al. 2007. Comparison of five in vitro digestion models to in vivo experimental results: Lead bioaccessibility in the human gastrointestinal tract. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* **42**:1203–1211.
- Venema K. 2015. The Impact of Food Bioactives on Health. Strana (Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, Requena T, Swiatecka D, Wichers H, editoři) *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models*. Springer International Publishing, Cham. Dostupné z <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-16104-4>.
- Wang H, Yang Y-J, Qian H-Y, Zhang Q, Xu H, Li J-J. 2012. Resveratrol in cardiovascular disease: what is known from current research? *Heart Failure Reviews* **17**:437–448. Dostupné z <http://link.springer.com/10.1007/s10741-011-9260-4>.
- Wang L et al. 2019. An update on polyphenol disposition via coupled metabolic pathways. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* **15**:151–165. Taylor & Francis. Dostupné z <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17425255.2019.1559815>.
- Wang P, Sang S. 2018. Metabolism and pharmacokinetics of resveratrol and pterostilbene. *BioFactors* **44**:16–25.
- Ward JPT, Linde RWA. 2017. *Physiology at a Glance*, 4. vydání. John Wiley & Sons, Incorporated, Oxford.
- Wong JMW, de Souza R, Kendall CWC, Emam A, Jenkins DJA. 2006. Colonic Health: Fermentation and Short Chain Fatty Acids. *Journal of Clinical Gastroenterology* **40**:235–243. Dostupné z <http://journals.lww.com/00004836-200603000-00015>.
- Wood LD, Montgomery EA. 2014. Structure and innervation of hollow viscera. *Gastrointestinal Anatomy and Physiology: The Essentials*:1–14.
- Wu L-S, Wang X-J, Wang H, Yang H-W, Jia A-Q, Ding Q. 2010. Cytotoxic polyphenols against breast tumor cell in *Smilax china* L. *Journal of Ethnopharmacology* **130**:460–464. Elsevier Ireland Ltd. Dostupné z <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874110003521>.
- Xu H, Dongari-Bagtzoglou A. 2015. Shaping the oral mycobiota: Interactions of opportunistic fungi with oral bacteria and the host. *Current Opinion in Microbiology* **26**:65–70.
- Xu L, Liu C, Xiang W, Chen H, Qin X, Huang X. 2014. Advances in the Study of Oxyresveratrol. *International Journal of Pharmacology* **10**:44–54. Dostupné z <http://www.scialert.net/abstract/?doi=ijp.2014.44.54>.

Zhu M-J. 2018. Dietary Polyphenols, Gut Microbiota, and Intestinal Epithelial Health. Strany 295–314 Nutritional and Therapeutic Interventions for Diabetes and Metabolic Syndrome Second Edi. Elsevier. Dostupné z <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128120194000246>.

9 Seznam obrázků

Obrázek 1 Základní chemická struktura antokyanů	15
Obrázek 2 Chemická struktura flavanolu	16
Obrázek 3 Chemická struktura flavonolu	16
Obrázek 4 Chemická struktura flavanonu	17
Obrázek 5 Chemická struktura isoflavonu	17
Obrázek 6 Chemická struktura flavonu	18
Obrázek 7 Základní chemická struktura stilbenoidů	18
Obrázek 8 Schéma syntézy stilbenů	19
Obrázek 9 Resveratrol	19
Obrázek 10 Pterostilben	20
Obrázek 11 Oxyresveratrol	21
Obrázek 12 Piceatanol	21
Obrázek 13 Schéma metabolismu resveratrolu	25
Obrázek 14 Graf závislosti průměrné koncentrace resveratrolu a dihydroresveratrolu na čase.	34
Obrázek 15 Graf závislosti resveratrolu a dihydroresveratrolu na čase	34

10 Seznam použitých zkratek a symbolů

ARCOL:	artificial colon = umělé tlusté střevo
BBFO:	broadband observation sonda
CDT:	<i>Clostridium difficile</i> toxin
COX:	cyklooxygenáza
CYP:	cytochrom P450
DAEC:	difúzně adherentní <i>Escherichia coli</i>
DGM:	dynamic gastric model = dynamický model žaludku
DMSO:	dimethylsulfoxid
DNA:	deoxyribonukleová kyselina
EAEC:	enteroagregační <i>Escherichia coli</i>
EIEC:	enteroinvazivní <i>Escherichia coli</i>
EHEC:	enterohemoragická <i>Escherichia coli</i>
EPEC:	enteropatogenní <i>Escherichia coli</i>
ESIN:	the engineered stomach and small intestinal systém = systém žaludku a tenkého střeva
ETEC:	enterotoxigenní <i>Escherichia coli</i>
FID:	signál volné precese
HGS:	human gastric simulator = simulátor lidského žaludku
iNOS:	indukovatelná syntáza oxidu dusnatého
KTJ:	kolonie tvořící jednotky
LDL:	lipoprotein s nízkou hustotou
NF:	nukleární faktor
NMR:	nukleární magnetická rezonance
PAL:	fenylalanin amoniak lyáza
ROS:	reaktivní sloučenina kyslíku
SHIME:	Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem = simulátor lidského intestinálního mikrobiálního ekosystému
SIMGI:	simulator of the gastrointestinal tract = simulátor gastrointestinálního traktu
SULT:	sulfotransferázy
TNF:	tumor necrosis factor = faktor nádorové nekrózy
UGT:	UDP-glukuronyltransferázy