

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality a bezpečnosti potravin



Metabolismus polyfenolů v buňkách střevní sliznice

Diplomová práce

**Bc. Aleška Dad'ová
Výživa a potraviny**

Doc. Ing. Jaroslav Havlík Ph.D.

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

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

V Praze dne 17.7.2020

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Jaroslavu Havlíkovi Ph.D. za vedení mé diplomové práce. Zároveň bych chtěla poděkovat Mgr. Petru Maršíkovi, Ph.D. za odborný dohled při zpracování výsledků a také své matce MUDr. Elišce Daďové za konzultaci některých odborných pojmů z oblasti medicíny a za její velkou podporu během celého mého studia.

Metabolismus polyfenolů v buňkách střevní sliznice

Souhrn

Polyfenoly tvoří jednu z nejhojnějších a všudypřítomných skupin rostlinných metabolitů a jsou nedílnou součástí lidské stravy. Hrají roli v antioxidační aktivitě, dále mají příznivý vliv na chronická onemocnění, jakými jsou například nádorová a kardiovaskulární onemocnění nebo nemoci spjaté s nervovým poškozením a stárnutím. Nejvíce zkoumaným polyfenolem je resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilben). Z některých studií vyplývá, že jeho deriváty mohou mít lepší biologickou dostupnost a bioaktivitu. Je proto snaha lépe porozumět farmakokinetice a biologické aktivitě jeho metabolitů.

V této práci byly pomocí modelu Caco-2 permeability assay zkoumány tři metabolity resveratrolu: oxyresveratrol, piceatannol a thunalben. Caco-2 permeability assay je *in vitro* metoda simulující funkci enterocytů. Pomocí této metody byla zkoumána dynamika vstřebávání již zmíněných metabolitů resveratrolu a jejich transformace. Pomocí LC/Q-TOF MS byla následně provedena analýza výchozích látek a jejich vybraných konjugátů na apikální a bazolaterální straně a v Caco-2 buňkách.

V průběhu experimentu byl z původních metabolitů resveratrolu detekován pouze oxyresveratrol. Zbylé dva metabolity byly detekovány až jako metabolity v konjugovaných formách. Nález konjugátů naznačuje, že při experimentu docházelo k tvorbě jejich polymerních forem, které byly následně během kultivace metabolizovány. Konjugace probíhala v buňkách. Většina konjugátů byla tvořena se sulfátem, příp. s glukuronovou kyselinou. Konjugáty byly následně buď transportovány přes apikální membránu zpět do střevního lumenu, nebo procházely dál přes bazolaterální membránu do krevního řečiště. Na základě těchto informací byly vyhodnoceny i jejich potenciální účinky.

Výsledky této práce poukazují na to, že bude dobré věnovat se těmto látkám nadále. Především sulfátové konjugáty metabolitů resveratrolu se zdají být slibnými kandidáty v biologických účincích *in vivo*, např. jako přípravky na ochranu enterocytů a zajistění jejich správné funkce.

Klíčová slova: Resveratrol, Caco-2, permeabilita, vstřebávání, transport, sliznice, buněčné linie

Metabolism of polyphenols in intestinal mucosa cells

Summary

Polyphenols form one of the most abundant and ubiquitous groups of plant metabolites and are an integral part of the human diet. They play a role in antioxidant activity and have a beneficial effect on chronic diseases, such as cancer and cardiovascular disease or diseases associated with nerve damage and aging. The most studied polyphenol is resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene). Some studies suggest that its derivatives may have better bioavailability and bioactivity. There is therefore an effort to better understand pharmacokinetics and the biological activity of its metabolites.

In this work, three metabolites of resveratrol were researched using the Caco-2 permeability assay model: oxyresveratrol, piceatannol and thunalbene. The Caco-2 permeability assay is an *in vitro* method that simulates enterocyte function. Using this method, the dynamics of absorption of the already mentioned metabolites and their transformation were researched. Using LC/Q-TOF MS, the starting materials and their selected conjugates on the apical and basolateral side and in Caco-2 cells were subsequently analyzed.

During the experiment, only oxyresveratrol was detected from the original metabolites of resveratrol. The remaining two metabolites were detected only as metabolites in conjugated forms. The finding of the conjugates suggests that the experiment resulted in the formation of their polymeric forms, which were subsequently metabolized during cultivation. Conjugation took place in cells. Most of the conjugates were formed with sulfate, or with glucuronic acid. The conjugates were then either transported across the apical membrane back to the intestinal lumen or passed further through the basolateral membrane into the bloodstream. Based on this information, their potential effects were evaluated.

The results of this work indicate that it will be good to continue to address these substances. In particular, sulphate conjugates of resveratrol metabolites appear to be promising candidates for biological effects *in vivo*, eg as agents to protect enterocytes and ensure their proper function.

Keywords: Resveratrol, Caco-2, permeability, absorption, transport, mucosa, cell lines

1	Obsah	
2	Úvod	8
3	Vědecká hypotéza a cíle práce	9
4	Literární rešerše	10
4.1	Polyfenoly	10
4.1.1	Chemická struktura a dělení polyfenolů	10
4.1.2	Zdroje v lidské stravě	12
4.2	Stilbenoidy	13
4.2.1	Struktura stilbenoidů	13
4.2.2	Resveratrol a jeho metabolity	14
4.2.3	Metabolismus resveratrolu	15
4.3	Vliv příjmu polyfenolů na lidské zdraví	17
4.3.1	Antioxidační účinky polyfenolů	17
4.3.2	Vliv polyfenolů na genovou expresi	18
4.3.3	Vliv polyfenolů na neurodegenerativní onemocnění	19
4.3.4	Vliv příjmu resveratrolu na expresi sitruinů	20
4.3.5	Vliv resveratrolu na střevní mikrobiotu a modulaci gut-brain axis	21
4.4	<i>In vitro</i> modely střevního epitelu	22
5	Materiál a Metodika	25
5.1	Materiál	25
5.1.1	Chemikálie	25
5.1.1.1	Chemikálie použité při měření	25
5.1.2	Přístroje	25
5.2	Metodika	25
5.2.1	Test propustnosti (permeability assay)	25
5.2.2	Příprava filtrační vložky s monovrstvou buněčné linie Caco-2	25
5.2.3	Měření integrity monovrstvy	26
5.2.4	Metabolismus a absorpce testovaných sloučenin	26
5.2.5	LC/MS analýza	26
6	Výsledky	28
6.1	Validace metody stanovení	28
6.2	Metabolismus sledovaných stilbenů	30
6.3	Identifikace demetylovaného SO₃H-konjugátu thunalbenu	35

7 Diskuze.....	37
8 Závěr	40
9 Literatura	41
10Seznam použitých zkratk	46

2 Úvod

Polyfenoly představují velkou chemickou třídu fytochemikálií. V dnešní době je věnována velká pozornost jejich biologické aktivitě a významu pro lidské zdraví. Strukturální rozmanitost polyfenolů vede k rozdílné rozpustnosti, stabilitě a biologické aktivitě. Řada experimentálních a epidemiologických studií podporuje potenciální využití polyfenolů pro prevenci různých patologických stavů souvisejících nejen s věkem. Roste zájem i o znalosti v oblasti jejich příjmu v potravě.

Přírodní přípravky jsou již od pradávna používány k léčbě nejrůznějších onemocnění. Následné analyzování jednotlivých chemických sloučenin a porozumění jejich funkcí mělo velký farmakologický význam. Přírodní zdroje tak získaly pozornost jako zdroje nových léků. 40 % léčiv na trhu schválených FDA (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv) je založeno na rostlinných produktech a 74 % z nich jsou protirakovinné léky.

Polyfenoly jsou velkou skupinou fytochemikálií s širokou chemickou diverzitou a rozdílnou bioaktivitou. Nacházejí se v potravinách, léčivých rostlinách i v nutraceutikách. Stravou přijmeme okolo 1 g polyfenolů denně. *In vitro* bylo popsáno působení mnoha z nich. Jejich obsah a prospěšné účinky je však zatím obtížné přesně prokázat *in vivo*. Důvodem je velká variabilita polyfenolových struktur a obtížnost určit přesný obsah polyfenolů ve zpracovaných nebo jakkoliv upravených potravinách. Je tedy snaha o detekci nových struktur a identifikaci jejich potenciálních významných biologických účinků.

Zájem o resveratrol je způsoben objevem jeho četných biologických aktivit a příznivých účinků na lidské zdraví. Sníží například riziko srdečních onemocnění, poškození neuronů, nádorových onemocnění a má pozitivní vliv na stárnutí. V poslední době mnoho studií začalo zkoumat metabolity resveratrolu. Vědci se domnívají, že by mohly mít i větší biologickou dostupnost a mohly by být také biologicky aktivní. Je proto dobré věnovat se i jednotlivým metabolitům a zkoumat jejich biologickou dostupnost.

Caco-2 permeability assay je *in vitro* metoda simulující funkci enterocytů. V dnešní době je hojně využívána, neboť korelace mezi touto permeabilitou *in vitro* a absorbovanou frakcí *in vivo* je dobře prozkoumána.

3 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem práce je prostřednictvím Caco-2 permeability assay stanovit dynamiku vstřebávání a transformace polyfenolů ze skupiny stilbenoidů v lidském tenkém střevě a zhodnotit vliv funkčních substituentů v molekule na tyto transformace.

Stilbenoidy jsou významnou skupinou přírodních látek s vlivem na řadu enzymů a transkripčních faktorů v těle. Mimo jiné se podílí na regulaci oxidačního stresu, zánětu a procesů stárnutí. Jsou přirozenou složkou stravy, například vína nebo ořechů. Resveratrol a řada dalších analogů je v současnosti testována v desítkách klinických studií. Znalost dynamiky vstřebávání přispěje k vývoji účinnějších forem.

V rámci práce budou s pomocí LC/Q-TOF MS analyzovány metabolity z apikální a bazální strany Caco-2 buněk dříve provedeného experimentu tzv. permeability assay, ve kterém byla testována dynamika transportu tří analogů resveratrolu. Bude testována hypotéza, že substituenty aromatických kruhů mohou měnit poměr vznikajících konjugátů v buňkách.

Vzorky z permeability assay byly po centrifugaci analyzovány s pomocí Bruker LC/Q-TOF MS a data byla zpracována cílenou analýzou po kvantifikaci dostupnými standardy v programu Data analysis. Byly spočítány kumulativní absorbní křivky přes buňky a odvozeny vztahy dynamiky absorpce derivátů v závislosti na místě a typu substituce molekuly.

4 Literární řešerše

4.1 Polyfenoly

Tyto látky jsou řazeny mezi sekundární metabolity rostlin, řas, hub a bakterií. Jejich primární funkcí je ochrana před ultrafialovým zářením, nízkými teplotami a suchem, také před býložravci, parazity a patogeny. Polyfenoly přispívají například k organoleptickým vlastnostem jednotlivých částí rostlin a jejich produktů (např. víno nebo olivový olej). Existují však také jako syntetické nebo polosyntetické organické formy (Vos et al. 2010).

4.1.1 Chemická struktura a dělení polyfenolů

Polyfenoly jsou charakterizovány přítomností více než jedné fenolové jednotky v molekule. Ve své nejzákladnější struktuře mají jednu nebo více hydroxylových skupin navázaných na benzenové jádro. Podle počtu fenolových kruhů a strukturních prvků, které jsou schopny vázat tyto kruhy k sobě, jsou definovány hlavní podskupiny polyfenolů: fenolové kyseliny, flavonoidy a méně běžné stilbenoidy a lignany. Složitá struktura polyfenolů je také dána jejich schopností interakce s jinými skupinami, jako jsou cukry, alkoholy a kyseliny. Polyfenoly mají více než 800 strukturních variant. Základní rozdělení polyfenolů je zobrazeno na obrázku č. 1 (Bravo. 2009).

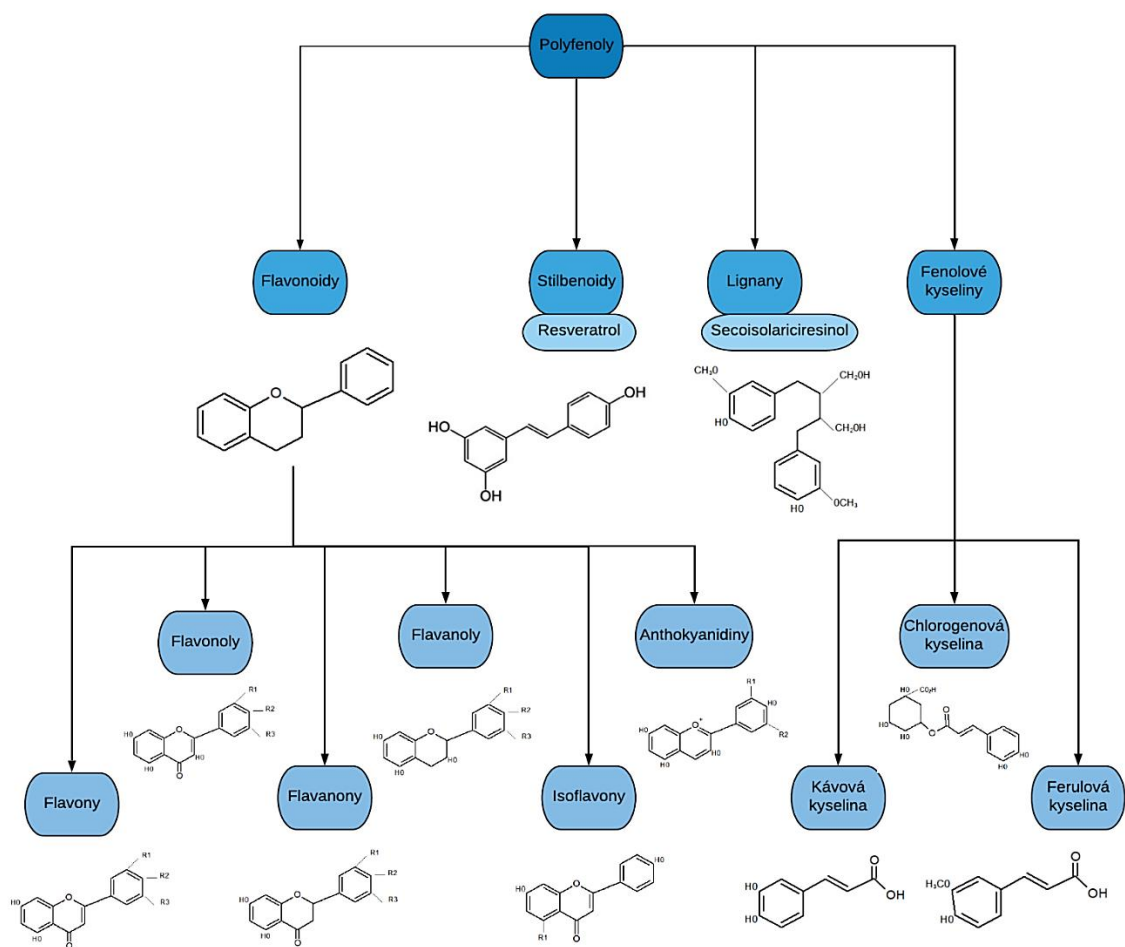
Nejpočetnější skupinou polyfenolů jsou flavonoidy. Flavonoidní sloučeniny dělíme na flavonoly, flavony, flavanony, anthokyanidiny, isoflavony a flavanoly. Nalezneme je v listech, květech a plodech rostlin (Pietta et al. 2003).

Stilbenoidy jsou především obsaženy v kořenech rostlin. Jedná se o látky příbuzné flavonoidům. Nejznámějším stilbenoidem je resveratrol neboli 3,4',5'-trihydroxystilben. Více informací o této skupině polyfenolů viz kapitola 4.2 Stilbenoidy (Dubrovina & Kiselev. 2017).

Lignany jsou nejvíce koncentrované v kůře, dřevě a pryskyřici. Významným zdrojem je například lněný olej. Lignany jsou v medicíně využívány jako cytostatika a antivirotika (Pietta et al. 2003).

Fenolové kyseliny jsou v potravě zastoupeny pouze v malém množství. Působí jako primární antioxidanty. Antioxidační aktivita těchto látek závisí na počtu hydroxylových skupin, které jsou vázány k aromatickému jádru (Pietta et al., 2003)

Polyfenoly se nejčastěji vyskytují ve vazbě s jednou nebo více molekulami sacharidů. Pokud se OH skupina váže přes atom kyslíku, tvoří tzv. O-glykosidy a pokud je vazba mezi uhlíkovými atomy, tvoří C-glykosidy. Nejběžnější cukerný zbytek je glukóza připojenými cukry však mohou být jiné monosacharidy, disacharidy nebo oligosacharidy. Existují také konjugace polyfenolů s jinými sloučeninami, jako jsou karboxylové a organické kyseliny, aminy, lipidy a jiné fenoly (Bravo. 2009)



Obrázek č. 1: Základní rozdělení polyfenolů (zhotoveno dle: Kim et al. 2016)

4.1.2 Zdroje v lidské stravě

Polyfenoly jsou běžnou součástí našeho jídelníčku. Jejich příjem činí průměrně zhruba 1 g/den. Množství přijatých polyfenolů závisí nejen na stravě, ale i na pohlaví a dalších socioekonomických faktorech. Průměrný příjem polyfenolů ve vybraných zemích je zobrazen v tabulce č. 1 (Scalbert & Williamson 2000; Pérez-Jiménez et al. 2010).

Tabulka č. 1: Průměrný příjem polyfenolů ve vybraných zemích: (Reinisalo et al. 2015; Taguchi et al. 2015; Ovaskainen et al. 2018; Zloch a kol. 2018)

Stát	Množství polyfenolů	Nejčastější potraviny
Španělsko	0,8–1,1 g/den	víno, ovoce, olivy a jejich produkty
Finsko	0,8–0,9 g/den	lesní plody, ovoce, zelenina
Japonsko	0,9–1,5 g/den	nápoje (80 %): káva, čaje
Česká republika	0,4 g/den	brambory, pšenice, káva, švestky
Spolková republika Německo	0,4 g/den	černý čaj, jádrové ovoce

Zpracování potravin může změnit zastoupení polyfenolů v samotné surovině. Například obsah kyseliny chlorogenové v kávě se liší v závislosti na různých druzích a stupních pražení. Složení kyseliny chlorogenové v kávě robusta je přibližně 9,4 g/100g zelené kávy, po pražení množství klesá na 3 g/100g. U kávy arabica je obsah kyseliny chlorogenové v zelené kávě kolem 7 g/100g a po pražení klesá na 2,8 g/100g (Moreira et al. 2017).

Naopak některé technologie zachovávají či zvyšují obsah polyfenolů ve výsledném produktu. Například výroba ovocných pyré z bobulí hroznů má celkově větší obsah polyfenolů než čistá šťáva z hroznů (bez slupek), neboť obsahuje i polyfenoly kovalentně vázané v buněčných stěnách a polyfenoly v matici (vláknina). Fermentace čajů a kakaových bobů také může zvýšit obsah polyfenolů. Každá čajová odrůda má charakteristický profil polyfenolů, který je následně ovlivňován fermentačními procesy. Například obsah polyfenolů v zeleném čaji je okolo 8,9 g/100g, po fermentaci je v černém čaji okolo 11,7 g/100g (Kroon et al. 1997, Lin et al. 2008).

Většina fenolických sloučenin obsažených ve víně pochází z hroznové slupky a semen. Polyfenoly jsou během výroby vína uvolňovány do hroznové šťávy. Koncentrace polyfenolů je proto výrazně vyšší v červeném víně kvasícím tzv. „na slupkách“ (od 0,8 do 1,3 mmol/l). Červená vína obsahují vysoký podíl antokyanů (červená barviva) a kondenzovaných taninů. Naopak bílá vína jsou vyrobena obvykle z volně tekoucí šťávy bez hroznového rmutu. Navíc bobule odrůd bílých vín mají i tenčí slupku, z toho důvodu mají nižší obsah polyfenolů a jejich antioxidační aktivita je oproti červeným vínům nižší. Koncentrace polyfenolů v bílém víně je od 0,35 do 0,55 mmol/l. Bylo zjištěno, že zvýšením koncentrace alkoholu (až na 18 %) došlo k výraznému posílení extrakce polyfenolů ze slupek hroznů do bílého vína až na 1,25 mmol/l. Bílé víno by tedy mohlo vykazovat

podobnou antioxidační kapacitu jako víno červené, pokud by docházelo ke kontaktu se slupkou hroznů v přítomnosti vyššího množství alkoholu (Fuhrman et al. 2001; Derya 2008).

4.2 Stilbenoidy

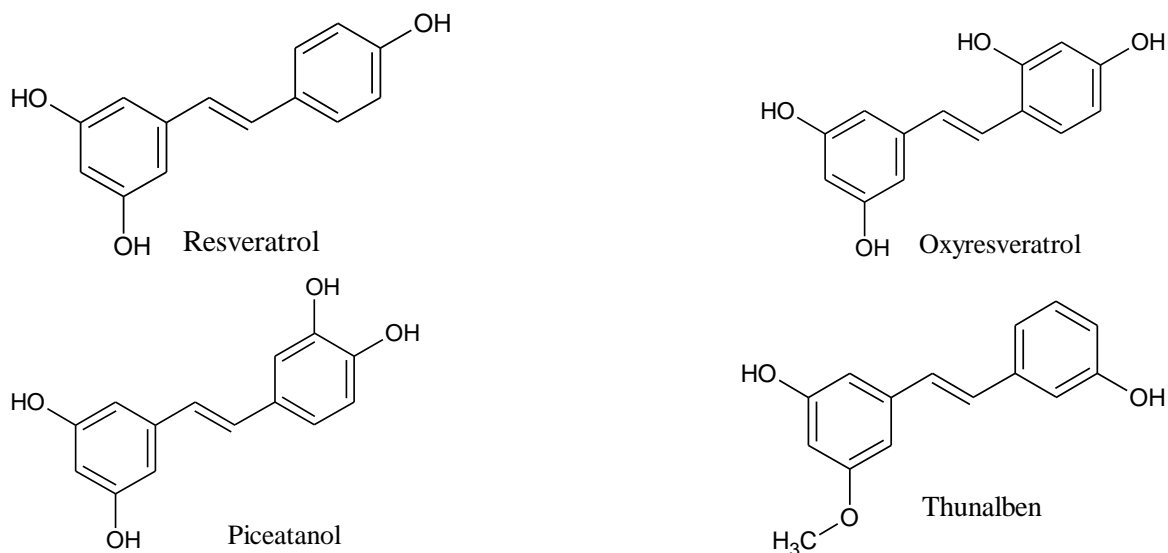
Stilbenoidy (či stilbeny) jsou skupinou polyfenolů s výraznými biologickými účinky na člověka. Jsou potvrzené řadou studií z posledních let. Mezi jejich hlavní účinky řadíme ochranu před oxidačním stresem a prevenci řady chorob včetně rakoviny, kardiovaskulárních a neurodegenerativních onemocnění. Denní příjem stilbenoidů se ve světě velmi liší, převážně z důvodu odlišného stravování. Stilbenoidy jsou obsaženy v celé řadě jedlých plodů a semen. Obsah stilbenoidů ve vybraných plodech a rostlinách je zobrazen v tabulce č. 2 (Dubrovina & Kiselev 2017).

Tabulka č. 2: Obsah stilbenoidů ve vybraných plodech a rostlinách (Rothwell et al. 2013)

Název rostliny:		Obsah polyfenolů:
Brusnice borůvka	<i>Vaccinium myrtillus L.</i>	9 mg/100 g
Jahodník obecný (jahoda)	<i>Fragaria L.</i>	105 mg/100g
Réva vinná (hrozny)	<i>Vitis vinifera L.</i>	99 mg/100g
Kávovník arabský (káva)	<i>Coffea arabica L.</i>	91 mg/100g
Kakaovník (kakao)	<i>Theobroma kakao</i>	511 mg/100g
Pohanka obecná	<i>Fagopyrum esculentum</i>	38 mg/100g
Bílá pšeničná mouka	<i>Triticum aestivum L.</i>	29 mg/100g
Celozrnná pšeničná mouka	<i>Triticum aestivum L.</i>	141 mg/100g

4.2.1 Struktura stilbenoidů

Struktura stilbenoidů je založena na C6 – C2 – C6 a je definovaná dvěma aromatickými kruhy spojenými ethenovým můstkem. Bylo identifikováno více než 400 derivátů stilbenoidů. Vybraní zástupci stilbenoidů jsou zobrazeni na obrázku č. 2. Základní stilbenový skelet může nést různé substituenty, jako je glykosyl, hydroxyl, methyl nebo isopropylové skupiny, které mohou být navázány v různých pozicích. Monomerní stilbenoidy mohou nabývat několika stupňů polymerace až na úroveň oktamerů (Pérez-Jiménez et al. 2010).



Obrázek č. 2: Vybraní zástupci stilbenoidů (zhotoveno dle Yang et al. 2007)

4.2.2 Resveratrol a jeho metabolity

Resveratrol ($C_{14}H_{12}O_3$) je polyfenolické nutraceutikum. Jeho účinnost, bezpečnost a farmakokinetika byla dokumentována ve více než 244 klinických studiích. Jeho účinky jsou zkoumány například v souvislosti s cukrovkou, rakovinou a s kardiovaskulárními a zánětlivými onemocněními. Resveratrol je označován jako bezpečný při dávkách do 5 g/den. Je podáván buď samostatně nebo v kombinované terapii (Gambini et al. 2015).

Resveratrol existuje v cis- a trans-izomerických formách. Trans-izomer je díky své otevřené formě stabilnější a biologicky dostupnější než cis-izomer. Přestože má resveratrol mnoho potenciálních účinků, jeho rychlý metabolismus v lidském těle omezuje jeho klinické využití. Biologická dostupnost orálně požitého resveratrolu je velmi nízká (pouze kolem 1 %). To značně omezuje jeho terapeutickou účinnost zejména v těch orgánech, které jsou vzdálené od gastrointestinálního traktu (Berman et al. 2017; Colica et al. 2018).

Dnes je identifikováno více než 20 metabolitů resveratrolu. Strukturální analogy resveratrolu jsou přítomny v léčivých rostlinách a vykazují významnou biologickou aktivitu. Z několika studií vyplynulo, že metabolity resveratrolu mají specifické biologické aktivity odlišné od samotného resveratrolu. Toto by mohlo i částečně vysvětlit prospěšné účinky na zdraví jedince samotného resveratrolu. Resveratrol je oproti svým metabolitům méně stabilní, snadno degraduje působením světla a vzdušného kyslíku. Bylo zkoumáno mnoho derivátů resveratrolu a studie prokázaly, že methylované deriváty resveratrolu byly se svou lepší biologickou dostupností a bioaktivitou účinnější například při léčbě rakoviny (Brown et al. 2010).

Piceatannol

Piceatannol (PIC, $C_{14}H_{12}O_4$) je oxidovaný metabolit resveratrolu obsažený například v hroznech révy vinné (*V. vinifera*) a plodech mučenky jedlé (*Passiflora edulis*). Ve srovnání s resveratrolem vykazuje piceatannol větší inhibiční aktivitu vůči cyklooxygenáze-2 (COX-2), která je klíčovým enzymem regulace zánětlivých procesů

prostřednictvím biosyntézy prostaglandinů. PIC také inhibuje aktivaci proteinových tyrosinkináz, které přenáší fosfátovou skupinu z vysokoenergetické donorové molekuly (např. ATP) na určitou cílovou molekulu a jsou součástí signálních drah. Dle studie Wandah et al. (2019) má PIC silnou antioxidační aktivitu a vykazuje preventivní protirakovinné vlastnosti. Moduluje buněčné signální dráhy, které vykazují potenciál v regresi nádoru a v potlačení invaze, migrace a tvorbě metastáz (Murias et al. 2004; Wahdan et al. 2019).

Oxyresveratrol

Oxyresveratrol (OXY, $C_{14}H_{12}O_4$) je méně zkoumaný stilbenoid. Byl nalezený například v moruše bílé (*Morus alba*). Oxyresveratrol vykazuje velkou biologickou aktivitu a vyšší rozpustnost ve vodě než resveratrol. Z výsledků studií vyplývá, že je velmi zajímavým kandidátem na podporu zdraví střeva. V jedné studii se zabývali deoxynivalenolem, což je hlavní kontaminant mykotoxinů narušující funkci střevní bariéry. Bylo zjištěno, že oxyresveratrol může pronikat do cytoplazmy, kde příznivě moduluje mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK). MAPK jsou enzymy, které se účastní širokého spektra buněčných pochodů (např. regulace exprese genů, mitóza, buněčná diferenciacce, proliferace a apoptóza). Ve studii autoři docházejí k závěru, že je oxyresveratrol účinný při posílení střevní bariéry a ochraně proti poškození střev. Mezi jeho další příznivé účinky řadíme například inhibici produkce TNF- α a silnější antioxidační aktivitu než má resveratrol (Kantartzis et al. 2018; Wan et al. 2018).

Thunalben

Thunalben (THU, $C_{15}H_{14}O_3$) je derivát stilbenu izolovaný z orchideje (*Thunia alba*). Studie o tomto metabolitu resveratrolu jsou teprve na počátku a nelze zatím specifikovat jeho účinky (Xu et al. 2019).

4.2.3 Metabolismus resveratrolu

Metabolismus je považován za jednu z hlavních příčin špatné biologické dostupnosti látek všeobecně, včetně stilbenoidů. Pro všechny stilbenoidy platí obdobný metabolismus. Příklad jejich metabolismu je v této práci uveden na resveratrolu. Resveratrol je metabolizován hlavně na glukuronidové nebo sulfátové konjugáty. Může se však metabolizovat i na dihydroresveratrol (volný i konjugovaný), který je výsledkem redukce alifatické dvojné vazby zřejmě působením střevní mikroflóry (Hoshino et al. 2010).

U lidí je resveratrol při perorálním podání, ať už jako aglykon nebo ve své glykosidické formě, absorbován poměrně rychle. Hladiny resveratrolu jsou snadno detekovány jak v plazmě, tak v moči. Resveratrol dosáhne nejvyšší koncentrace v plazmě přibližně po 30–60 minutách po požití. Množství volného resveratrolu v plazmě a v séru představuje méně než 2 % celkového resveratrolu. Plazmatické koncentrace jeho metabolitů jsou vyšší než u mateřské sloučeniny (Walle. 2011).

Střevní mikrobiota

Zdá se, že metabolické enzymy fáze II a střevní mikrobiota hrají klíčovou roli v biotransformaci resveratrolu. Předběžné studie ukázaly, že střevní mikroorganismy ovlivňují zastoupení produkovaných resveratrolových metabolitů. Například skupiny *Actionobacteria Coriobacteriaceae* a *Sphingobacteria Bacteroides spp.* jsou schopny metabolizovat resveratrol na dihydroresveratrol. Ve studii Jarosova et al. (2018) byl dihydroresveratrol detekován jako hlavní metabolit. Složitá metabolická aktivita mikrobu v tlustém střevě může být zodpovědná za kolísání koncentrací metabolitu resveratrolu mezi jednotlivci. Střevní mikrobiota má schopnost metabolizovat resveratrol a zároveň ovlivňovat jeho osud a fyzioterapeutické účinky (Bird et al. 2017; Jarosova et al. 2018).

Enterohepatální oběh

Po vstupu do krevního oběhu je resveratrol absorbován do endoteliálních buněk prostřednictvím pasivní difúze a aktivním zprostředkováním pomocí transportérů. Jedním z nich je transportér MRP2, který primárně transportuje organické anionty. U lidí je exprimován v mnoha tkáních, zejména v játrech, ledvinách a gastrointestinálním traktu (GIT). V játrech usnadňuje vylučování bilirubinových glukuronidů a konjugátů do žluči. MRP2 je lokalizován na apikální membránové straně enterocytů a hepatocytů. Zde zprostředkovává jednosměrný transport substrátů na lumenální stranu orgánu. Většina sulfátového konjugátu resveratrolu je exportována na apikální stranu pravděpodobně právě pomocí MRP2. Další membránové transportéry s podobnými substrátovými specifitami jsou MRP3 a MRP4. Vyskytují se na bazolaterální membráně hepatocytů. Při vysokých koncentracích resveratrolu a jeho metabolitů dochází k transportu na bazolaterální stranu pravděpodobně pomocí MRP3. Ve studii Schwager et al. (2017) zjistili, že kromě tohoto při kontaktu s endoteliálními buňkami mohou resveratrol a další stilbenoidy snadno působit na monocyty a makrofágy. To může mít za následek regulaci proliferace a apoptózy umožňující modulaci zánětlivých profilů v cévních buňkách a na kardiomyocytech (Kaldas et al. 2003; Schwager et al. 2017).

Enzymatická přeměna

Glukuronosyltransferázy (UGT) hrají důležitou úlohu v metabolismu resveratrolu. Jako hlavní glukuronidové metabolity byly popsány resveratrol-3- nebo -4-O-glukuronid. Enzymatická skupina UGT katalyzuje konjugaci resveratrolu s glukuronovou kyselinou prostřednictvím některé z jejích čtyř hydroxylových skupin. Tímto dochází i ke změnám biologických vlastností resveratrolu a k usnadnění vylučování. Jaterní mikrozomy obsahují vysoké koncentrace těchto enzymů a přednostně tvoří resveratrol-3-O-glukuronid. Dále bylo zjištěno, že enzym UGT-1A1 byl většinou zodpovědný za vznik resveratrol-3-O-glukuronid, zatímco enzym UGT-1A9 za -4-O-glukuronid (Wang & Sang, 2018).

Sulfatace je další hlavní cesta eliminace polyfenolů z lidského těla. Ve studii Wang & Sang (2018) uvedli jako hlavní produkty sulfatace resveratrolu resveratrol-3-O-sulfát a -4-O-sulfát. Lidské sulfotransferázy (SULT) 1A1, 1A2, 1A3 a 1E1 jsou zodpovědné za tvorbu metabolitů resveratrolu. Resveratrol-3-O-sulfát vzniká především pomocí enzymů SULT-1A2 a SULT-1A3. Resveratrol-4-O-sulfát je katalyzován hlavně SULT-1E1 (Wang & Sang, 2018).

4.3 Vliv příjmu polyfenolů na lidské zdraví

4.3.1 Antioxidační účinky polyfenolů

Antioxidanty jsou všeobecně účinnými zhášeci volných radikálů (reaktivních forem kyslíku (ROS)). Jsou schopny inhibovat volné radikály prostřednictvím poskytnutí, dodání nebo přenosu elektronů. Zapojují se i aromatické struktury, které zhášejí volné radikály. Polyfenoly jsou redukční činidla a společně s dalšími dietetickými redukčními činidly, jako jsou vitaminy C, E a karotenoidy, chrání lidskou tkáň před oxidačním stresem a nemocemi s ním spojenými, jako jsou například kardiovaskulární a zánětlivá onemocnění nebo rakovina. Antioxidační aktivita polyfenolů spočívá především v narušování iniciace nebo propagace a v přerušování reakcí volných radikálů (Scalbert & Williamson 2000).

Již v dřívějších studiích bylo zjištěno, že příjem polyfenolů může být 10x vyšší než příjem vitamínu C a 100x vyšší než příjem vitamínu E. Například ve studii Singleton & Rosii (1965) zkoumali antioxidační kapacitu polyfenolů červeného vína. Vědci zjistili, že konzumace 300 ml červeného vína (obsahující 500 mg polyfenolů) vyvolala podobné zvýšení plazmatické antioxidační kapacity jako 1 g kyseliny askorbové (vit. C). K podobným závěrům dospěl i Duthie et al. (1998), který upozoroval na zvýšení koncentrace polyfenolů v plazmě o 15 μM po požití 100 ml červeného vína (Duthie et al. 1998; Singleton & Rossi. 1965).

Studie z roku 2002 měřila antioxidační aktivitu polyfenolů v jablečné šťávě pomocí ABTS. Antioxidační aktivita byla následně vyjádřena jako antioxidační kapacita ekvivalentní vitamínu C (VCEAC) v mg/100g jablka. Čerstvá jablka Gala měla VCEAC $205,4 \pm 5,6$ mg/100g. A při měření relativní VCEAC jednotlivých polyfenolů vyšlo, že epikatechin a katechin mají vyšší antioxidační potenciál, než vitamin C. Celková intenzita antioxidační aktivity vybraných polyfenolů vyšla v této studii následovně: epikatechin > katechin > vitamin C > rutin > kyselina chlorogenová > vitamin E. Tyto studie nám tedy naznačují, že polyfenolové sloučeniny mohou být hlavními bioaktivními složkami potravin v přerušování reakcí volných radikálů (Kim. 2002).

Polyfenoly mají jak přímé, tak i nepřímé účinky. Mezi přímé patří již zmíněné přerušování reakcí volných radikálů. Do nepřímých, jak zmiňuje ve své práci například Dhakal et al. (2019), je zařazena aktivace faktoru Nrf2. Ten reguluje expresi antioxidačních enzymů, které hrají hlavní roli při obnově redoxní rovnováhy a při buněčné signalizaci. Mezi antioxidační enzymy řadíme například: katalázu, superoxiddismutázu a enzymy, které mohou regenerovat a produkovat endogenní antioxidanty (glutathion reduktáza, thioredoxin reduktáza nebo glutathion syntetáza). Ve srovnání s přímými antioxidačními účinky polyfenolů na ROS, které byly pozorovány při koncentracích 10–100 μM , je antioxidační aktivita na základě aktivovaných enzymů patrná již při nižší koncentraci (0,5–5 μM). Ve studii Ferreira (2014) provedené *in vitro* uvedli, že nepřímá enzymatická cesta je účinnější a účinek přetrvává, i když už polyfenoly nejsou přítomny *in situ* (Ferreira. 2014; Dhakal et al. 2019).

Peroxidace lipidů

Na problematiku peroxidace lipidů je v poslední době vedeno mnoho studií. Lipidy jsou hlavními složkami buněčných membrán a také častými cíli oxidačního stresu. Produkty oxidace lipidů jsou peroxidy, které mohou mít toxické účinky na další buněčné složky, jako je DNA nebo proteiny. Studie Treml et al. (2019) hodnotila účinky stilbenoidů na peroxidaci lipidů v linolové kyselině *in vitro*. V této studii bylo po dobu 24h sledováno působení stilbenoidů na hladiny ROS. Byla použita koncentrace 2 μM vybraných stilbenoidů, kterou již předchozí testy označily jako netoxickou pro všechny složky. Trans-stilbeny celkově inhibovaly peroxidaci lipidů ze 46,4 % (Treml et al. 2019).

V návaznosti na již zmíněnou studii Dhakal et al. (2019) zjistili, že piceatannol má přímý antioxidační účinek na vychytávání ROS. Také blokuje peroxidaci lipidů, cholesterylesterů a triglyceridů omezením produkce lipoproteinů o velmi nízké hustotě (VLDL a LDL), s pozitivními účinky na aterogenezi. Podobné efekty jsou prokázány i u flavonoidů (kvercetin, katechin a epikatechin) (Flamini et al. 2018; Dhakal et al. 2019).

4.3.2 Vliv polyfenolů na genovou expresi

Kardiovaskulární onemocnění (KVO) jsou řazena k nejčastějším příčinám úmrtí ve světě. KVO je skupina nemocí nepříznivě ovlivňujících srdce a cévy. Tyto nemoci obvykle vyplývají z poškození artérií, proto příznaky a léčba těchto onemocnění je závislá na závažnosti postižení cév. V dnešní době je snaha o prevenci vzniku KVO, byla proto provedena řada experimentů *in vitro*, kde byly simulovány pochody endoteliálních buněk. Například ve studii Nicholson et al. (2008) využili *in vitro* metodu HUVEC a zkoumali účinky kyseliny ferulové, kvercetin a resveratrolu na genové exprese. Vědci zjistili, že tyto tři polyfenolické sloučeniny až dvojnásobně zvyšují expresi 233 genů (přibližně 2 % genů) a stejně tak i snižují expresi 363 genů (přibližně 4 % genů). Polyfenoly dále ovlivňují geny týkající se především transportu, enzymatické aktivity, buněčné signalizace nebo transkripce, jsou také zapojeny do DNA oprav nebo apoptózy. Dále bylo zjištěno, že většina postižených genů reagovala na léčbu hlavně resveratolem, který se vyskytoval ve fyziologické koncentraci (0,1 mM) (Nicholson et al. 2008).

Na předchozí hypotézu, že by mohl mít resveratrol vliv na genovou expresi navazuje studie Bomba et al. (2014). Ta se zabývala resveratolem ve stravě těhotných prasnic. Zkoumali, zda bude mít resveratrol vliv na genovou expresi střeva a mikrobioty jejich selat či nikoliv. Už dříve Poudel et al. (2013) poukázali na to, že resveratrol může pronikat přes placentu. Prasata byla navržena jako nejlepší modely pro výživu lidí na základě své všežravé povahy a podobnosti ve velikosti a fyziologii střev člověka. Těhotné prasnice měly stravu po dobu 20 dní doplněnou 300 mg resveratrolu/kg stravy. Selata byla ihned po narození poražena a pro testy byly použity vzorky jejich jejunu. Oproti kontrole došlo u selat prasnic krmených resveratolem k výraznému snížení zánětlivé odpovědi pomocí aktivace genů zapojených do buněčné diferenciaci a proliferace, také genů související s imunitními buňkami a záněty, například AFAP1L2 (podílející se na regulaci produkce interleukinu-6), CCL5 (účastníci se na pozitivní regulace

proliferace T-lymfocytů*), LTF (podílející se na regulaci nádoru a produkce faktoru nekrózy). Došlo i k regulaci genů souvisejících s buněčnou apoptózou, včetně HIP1 (zapojený do apoptotické signální dráhy) a CD3G (zapojený do regulace apoptického procesu lymfocytů) (Bomba et al. 2014).

*U signální dráhy receptorů T-lymfocytů analýza odhalila, že všechny aktivované geny byly regulovány resveratrolem. Podstatou skupiny těchto T-lymfocytů je řízení specifické buněčné imunity a střevní imunitní sítě pro produkci IgA (Poudel et al. 2013).

4.3.3 Vliv polyfenolů na neurodegenerativní onemocnění

Neurodegenerativní onemocnění (ND) jsou multifaktoriální poruchy charakterizované progresivní dysfunkcí a neuronálním poškozením, která ovlivňují normální fungování mozku včetně učení a paměti. Příklady ND jsou Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba a amyotropní laterální skleróza. Podle Huang et al. (2018) je patogeneze těchto onemocnění výsledkem mnoha procesů, jako je například oxidační stres a abnormální apoptóza. Apoptóza je proces programované buněčné smrti, který je nezbytný pro normální nervový vývoj (Huang et al. 2018).

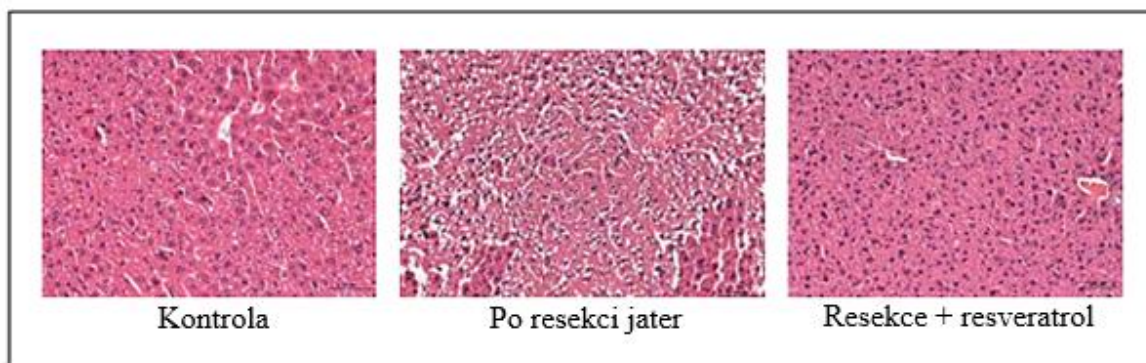
Signální dráhy mohou být interakčními cestami proti ND. Mezi tyto významné cesty řadíme například PI3K-Akt (regulaci buněčného cyklu), p53 (transkripční faktor zabráňující vzniku nádorů) a signální dráhy apoptózy. Ve studii Wang N. et al. (2019) sledovali multifaktorové efekty resveratrolu, které na rozdíl od specifických cílových léků reagovaly na různé změny spojené s ND *in vivo*. Uvedli, že resveratrol inhibicí neuronální apoptózy zlepšil kognitivní funkci potkanů a snížil poškození neuronů, které byly vyvolané oxidačním stresem ve frontální kůře a hippocampu. Na tuto studii navázali Wang W. et al. (2020). Ti hodnotili resveratrol jako víceúčelového činitele proti neurodegenerativním onemocněním *in vitro*. Použili resveratrol v koncentraci 50 mg/ml na glutamátem indukované apoptotické buňky. V této studii bylo na základě potenciálních cílů resveratrolu a genů spojených s onemocněním identifikováno 138 genů. Například Bcl-2 je klíčovým členem antiapoptotické skupiny genů Bcl. Bylo prokázáno, že nadměrně exprimovaný Bcl-2 chrání nervové buňky před poškozením neurotoxiny. Výsledky prokázaly, že resveratrol výrazně zvýšil hladinu Bcl-2. K tomu samému došli i ve studii Zhang. et al. (2019) *in vivo* na potkanech. Studie na buněčných i zvířecích modelech tak docházejí k závěru, že resveratrol chrání buňky před nežádoucí apoptózou a neurodegenerativním onemocněním. Je to aktivní sloučenina, u které se očekává, že bude dále testována jako budoucí lék působící na více cílů proti neurodegenerativním onemocněním (Zhang et al. 2019; Wang N. et al. 2019; Wang W. et al. 2020).

4.3.4 Vliv příjmu resveratrolu na expresi sirtuinů

Dalším významným molekulárním cílem stilbenoidů jsou sirtuiny. Jde o zajímavou skupinu epigenetických proteinů. Jejich aktivace snižuje oxidační stres, inhibuje zánětlivé odpovědi a zpomaluje buněčné stárnutí. Sirtuiny se také podílejí na životaschopnosti neuronálních buněk a na regulaci imunitních a zánětlivých reakcí. Řada studií se v poslední době věnuje aktivaci těchto sirtuinů. Je vedena řada hypotéz, že by právě resveratrol mohl být jejich potencionálním aktivátorem (Cao et al. 2018).

Studie Mayack et al (2020) popisuje výskyt sirtuinů téměř u všech skupin živých organismů, včetně některých virů. Savci mají 7 různých sirtuinů a právě o sirtuinu-1 jsou vedeny diskuze, že by jeho aktivátorem mohl být právě resveratrol. Přičemž exprese sirtuinu-1 (Sirt1) by mohla potlačit aktivitu několika nádorů, jako jsou rakovina prsu, leukémie, rakovina prostaty a tlustého střeva. Ve studii Deus et al. (2017) hodnotily toxicitu resveratrolu u buněčné linie lidské rakoviny prsu *in vitro*. Dále se zabývali tím, zda je mechanismus účinky resveratrolu závislý na hladině Sirt1. Buňky rakoviny prsu byly během 48h inkubovány s 10, 25 a 50 μM resveratrolu. Jeho nejúčinnější koncentrace byla 50 μM . Z výsledků této studie vyplynulo, že resveratrol vyvolává inhibici cyklu rakoviny prsu ve fázi S nebo G0 – G1. Při otázce ohledně mechanismu účinku resveratrolu došli vědci k závěru, že je resveratrol cytotoxický pro buněčné linie lidské rakoviny prsu sám o sobě a zároveň zvyšuje množství proteinu Sirt1. Sirt1 následně vyvolává metabolické remodelace a diferenciaci v těchto rakovinných buňkách. Návrh vývoje molekul, které stimulují aktivitu sirtuinu v rakovinných buňkách, může tedy vést k nalezení nových terapeutických strategií při zvýšení účinnosti chemoterapie (Deus et al., 2017; Mayack et al. 2020).

Sirtuiny jsou spojovány i s urychlením hojení a snížením rizika infekcí. Příkladem může být resekce jater, což je nejčastější a nejúčinnější léčba rakoviny jater. Po operaci však může docházet k řadě komplikacím u poškozené tkáně. To může způsobit aktivaci zánětlivých markerů. Je tedy snaha o to vyvinout účinnou strategii pro zamezení komplikací spojených s částečnou resekcí jater. Úroveň Sirt1 v normální jaterní tkáni je velmi nízká. Ve studii Portmann et al. (2013) však poukázali na to, že Sirt1 může hrát důležitou roli v hojení poškozené tkáně po resekcii jater. Je tedy snaha o to nalézt vhodné aktivátory Sirt, které by podpořily jeho expresi a funkci. Na tuto myšlenku navazuje i studie Yu et al. (2019), kde zkoumali ochranný mechanismus resveratrolu *in vivo* na potkanech po resekcii jater. Resveratrol byl v dávce 30 mg/kg/den podáván potkanům od jednoho týdne před operací až do jejich smrti. Histologie jaterních tkání po resekcii vykazovala významné zlepšení v morfologii jater u potkanů ošetřených resveratrolem. Výsledky poukazují na to, že resveratrol může snížit poškození jater způsobené resekcí jater a urychlit hojení tkáně. Porovnání mezi kontrolní skupinou (bez resekce) a skupinou ošetřenou resveratrolem je zobrazeno na obrázku č. 3. Resveratrol prostřednictvím signální dráhy Sirt1 snížil hladiny ALT, AST, γ -GT (ukazatele pro výskyt jaterní léze) a celkového bilirubinu. Tím byla potvrzena i studie Xu et al. (2014), kde resveratrol také zvýšením regulace Sirt1 snížil poškození jater po resekcii *in vivo* (Portmann et al. 2013; Xu et al. 2014; Yu et al. 2019).



Obrázek č. 3: Porovnání hojení tkáně mezi kontrolní skupinou (bez resekce), tkání po resekci a skupinou ošetřenou resveratrole (po resekci) (Yu et al. 2019)

4.3.5 Vliv resveratrolu na střevní mikrobiotu a modulaci gut-brain axis

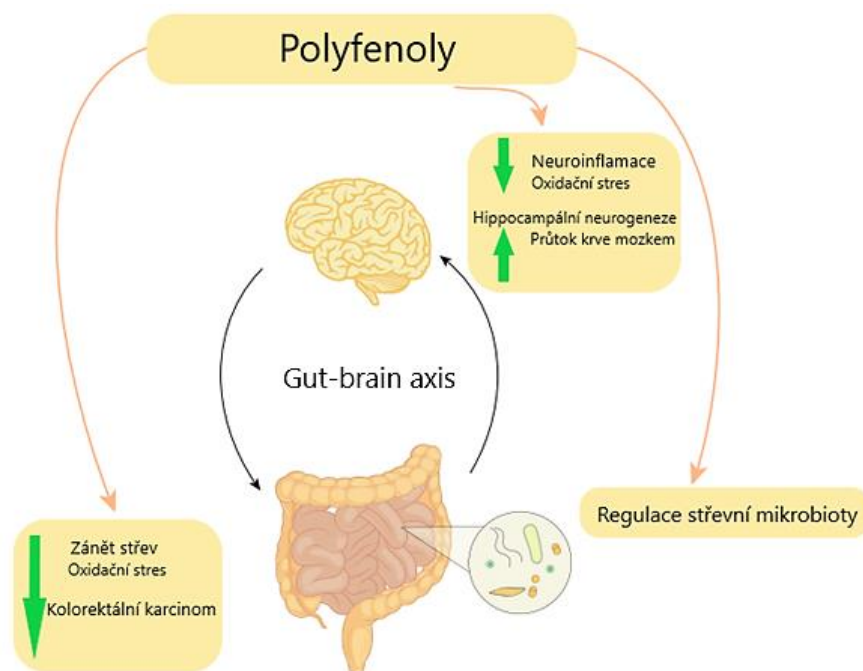
Jak je již zmíněno v kapitole 4.2.4, střevní mikrobiota má schopnost metabolizovat resveratrol a zároveň ovlivňovat jeho osud v organismu a fyzioterapeutické účinky. Resveratrol může mít zároveň vliv i na složení bakteriálních druhů ve střevě. Jung et al. (2009) studovali aktivitu lidské mikrobioty *in vitro*. Ukázalo se, že při koncentraci resveratrolu 50 mg/l došlo ke snížení rychlosti růstu většiny patogenních kmenů až o 25 % oproti kontrole. Podobné výsledky měla i studie *in vivo* provedená na myších. V této studii vyšlo, že 4 g resveratrolu/kg ž.hm. způsobují remodelaci střevní mikrobioty. Dále došlo k nárůstu příznivých kmenů *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, a *Akkermansia* a klesal počet u patogenních bakterií *Prevotelle*, *Ruminococcaceae*, *Anaerotruncus*, *Helicobacter* a *Peptococcaceae*. V klinické studii Most et al. (2017) byl respondentům 2x denně po dobu 12 týdnů podáván resveratrol (40mg) společně s EGCG (epikatechin galát) (141mg). Z výsledků nelze zcela přesně určit účinek samotného resveratrolu. Lze však říci, že u respondentů také došlo ke snížení hojnosti patogenních bakterií (*Firmicutes*, *Actinobacteria*, *g-Proteobacteria*, *Akkermansia*) a dále bakterií redukujících síran a acetogenních bakterií (Jung et al. 2009; Most et al. 2017).

Gut-brain axis

Gut-brain axis neboli osa střevo-mozek je obousměrné spojení mezi centrálním nervovým systémem a enterickým nervovým systémem, který řídí funkci gastrointestinálního traktu. Jde tedy o vztah mezi centry v mozku a funkcí periferního střeva. Jednotlivé vztahy gut-brain axis jsou zobrazeny na obrázku č. 4. Polyfenoly pozitivně ovlivňují střevní mikrobiotu, která má následně vliv na intestinální imunitní buňky. Díky tomu může regulovat lymfocyty v tenkém střevě, které následně snižují riziko ischemické mozkové příhody. Naopak dysbióza střevní mikrobioty a poruchy gastrointestinálního traktu jsou často zkoumány v kontextu s neurologickými poruchami (Serra et al. 2018).

Nedávný výzkum *in vivo* na myších sledoval neuroprotektivitu resveratrolu pomocí gut-brain axis. V této studii byly myši podrobeny okluzi mozkové tepny (na 60 minut),

po které následovalo obnovení průtoku krve po dobu 3 dnů. V těchto dnech byl myším aplikován resveratrol. U myši krmených resveratrolem došlo pomocí snížení epitelové a cévní propustnosti tenkého střeva k regulaci přenosu ischemicky indukovaných zánětlivých cytokinů z tenkého střeva do krve. Dále bylo vyhodnocováno narušení hematoencefalické bariéry po ischemii pomocí cévního indikátoru. Únik indikátoru do ischemického mozkového parenchymu byl u myši neléčených resveratrolem dvojnásobně vyšší než u myši léčených resveratrolem (Dou et al. 2019).



Obrázek č. 4. Gut-brain axis (zhotoveno dle: Serra et al. 2018)

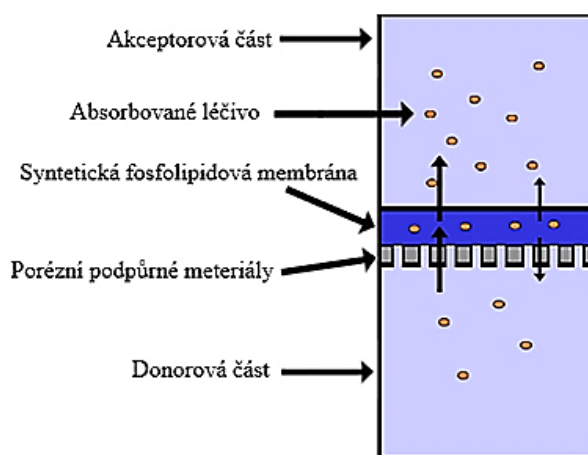
4.4 *In vitro* modely střevního epitelu

Snadnou cestou, jak podávat léčivé přípravky s následným předpokladem klinického účinku, je orální cesta s absorpcí napříč střevní bariérou. Existuje řada *in vitro* metod, jak můžeme studovat pochody střevního traktu a pochopit tak jednotlivé kroky podílející se na transportu látek do oběhového systému. Do těchto předklinických modelů *in vitro* propustnosti stěny střev můžeme zařadit například *in situ* perfuzi krysího jejunu, model PAMPA, buňky Caco-2 a také střevní segmenty v Ussingově komoře (Lennernäs. 1998).

PAMPA

PAMPA, neboli paralelní test propustnosti, je screeningová technika vyvinuta k předpovídání pasivní propustnosti prostřednictvím řady různých biologických membrán, jako je gastrointestinální trakt a hematoencefalická bariéra. PAMPA se skládá z umělé membrány, která odděluje donorovou a akceptorovou část. Její model je zobrazen na obrázku č.5. Membrána je nejčasteji tvořena hexadekanem. PAMPA je využívána například pro predikci gastrointestinální absorpce v raných stádiích objevu léčiva.

Její stinnou stránkou však je, že nemůže předpovídat zahrnující procesy absorpce zprostředkované transportéry nebo paracelulární cestu (Bujard et al. 2017).

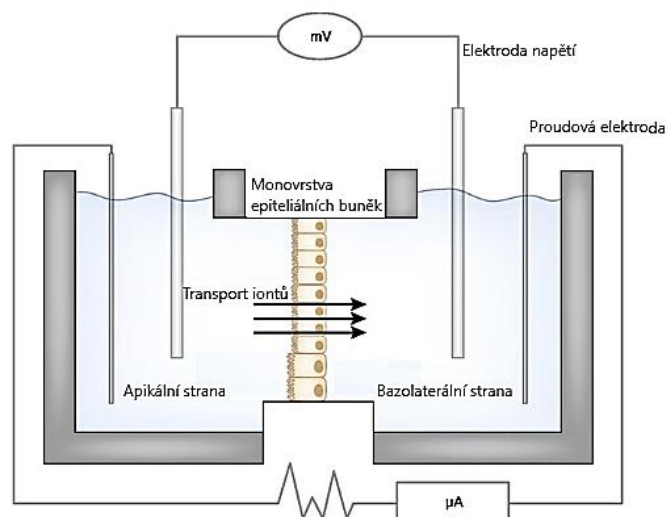


Obrázek č. 5: Model PAMPA (zhotoveno dle: Yu et al. 2015).

Jedním z jejich modelů je Skin-PAMPA. Ta je využívána pro predikci penetrace pokožkou. Jde o směs lipidových membrán (ceramid, volné mastné kyseliny a cholesterol). Ve studii Casamonti et al. (2019) byla zkoumána penetrace samotného resveratrolu a resveratrolu v komplexu s lipozomy (uměle vzniklé kulovité struktury vytvořené z lipidové dvouvrstvy). Tato struktura byla zkoumána za účelem zlepšení lokálního podání resveratrolu. Skin-PAMPA prokázala zvýšenou kožní permeabilitu resveratrolu, když byl vložen do lipozomů. Formulace si udržela i antioxidační kapacitu resveratrolu. Lipozomy by tedy podle studie Casamonti et al. (2019) mohly být vhodným systémem pro lokální dodání resveratrolu. Skin-PAMPA se ukázala jako účinný nástroj pro studium propustnosti nejen resveratrolu, ale také jeho formulací (Casamonti et al. 2019).

Ussingova komora

Ussingova komora je zařízení, které dokáže detekovat a kvantifikovat transportní a bariérové funkce živé tkáně. K měření využívá transport iontů v nativní tkáni (např. střevní sliznice) a v monovrstvě buněk pěstovaných na propustných nosičích. Pro predikci absorpce léčiv a jiných látek jsou využívány segmenty z biopsie lidské střevní nebo slizniční tkáně. Hlavní výhodou využívání živé tkáně je udržování morfologické struktury a funkcí transportérů a enzymů metabolizujících léčiva, což odráží stav *in vivo*. Ussingova komora tak poskytuje dobrou příležitost předvídat rychlost absorpce perorálního léčiva či jiné látky *in vivo* (Rozeňal et al. 2012).

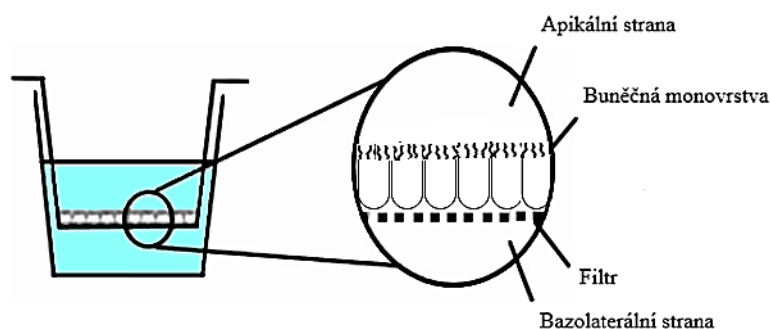


mV- milivolt, μA - mikroampér

Obrázek č. 6 Model Ussingova komora (zhotoveno dle: (Hoenig & Zeidel. 2014))

Caco-2 permeability assay

Caco-2 buněčná linie je kontinuální linie heterogenního lidského epitelu buněk karcinomu tlustého střeva. Tyto buňky jsou kultivovány za specifických podmínek. Jsou diferencované a polarizované tak, že jejich fenotyp morfologicky a funkčně připomíná enterocyty. Jedná se o těsně spojené buňky obsahující řadu enzymů a transportérů charakteristických pro lidské enterocyty. Model Caco-2 je zobrazen na obrázku č. 7. Buňky Caco-2 se nejčastěji používají ve formě monovrstvy na vložkovém filtru buněčné kultury (např. Transwell). Buňky jsou následně diferenciovány za vzniku polarizované monovrstvy epitelálních buněk, která poskytuje fyzickou a biochemickou bariéru pro průchod iontů a malých molekul. Monovrstva Caco-2 je široce používána ve farmaceutickém průmyslu jako *in vitro* model lidské sliznice tenkého střeva. Slouží k predikci absorpce orálně podávaných léčiv a různých organických látek (Hubatsch. 2007).



Obrázek č. 7: Caco-2 permeability assay (zhotoveno dle: Hubatsch et al. 2007)

5 Materiál a Metodika

5.1 Materiál

5.1.1 Chemikálie

5.1.1.1 Chemikálie použité při měření

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

5.1.2 Přístroje

Inkubátor 1000, Heidolph – Německo

Centrifuga Rotanta 460R – Německo

UHPLC Ultimate 3000, Thermo Scientific – USA

MS Q-TOF Impact II Bruker Daltonic – Německo

Vortex Phoenix Instrument RS-VF10 – Německo

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

5.2 Metodika

Vzorky byly centrifugovány za účelem oddělení větších částic a rozpuštěny 1:1 v čistém methanolu. Vzorky byly analyzovány s pomocí kapalinového chromatografu Bruker LC-QTOF/MS a data byla následně zpracována cílenou analýzou po kvantifikaci dostupnými standardy v programu DataAnalysis.

5.2.1 Test propustnosti (permeability assay)

Buněčná linie Caco-2 byla získána z American Type Tissue Collection (Rockville, Maryland, USA). Permeability assay byla zhotovena dle Jarosova et al. (2018).

5.2.2 Příprava filtrační vložky s monovrstvou buněčné linie Caco-2

Buňky byly odděleny od média a následně rozptýleny v MEM-F12 (Dulbeccovo modifikované Eaglesovo médium) doplněného o 10% FBS (fetální hovězí sérum), 1% neesenciálních aminokyselin, 1% penicilinu a streptomycinu. Látky v koncentraci $0,6 \times 10^6$ buněk/ml byly získány od Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika). Buněčné kultury byly uloženy do 24-jamkových destiček. Před naočkováním buňkami byla zvlhčena 50 μ l média po dobu alespoň 2 minut. Buňky byly následně aplikovány na apikální stranu. Hustota očkování byla $2,6 \times 10^5$ buněk/cm². Bazolaterální komora byla naplněna 1 ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) a inkubována při 37 °C v 5% atmosféře CO₂. Po 6 hodinách inkubace bylo apikální médium odstraněno a nahrazeno 0,5 ml čerstvého DMEM. Médium bylo měněno denně, nejprve z bazolaterální a poté z apikální strany. Čerstvý DMEM byl naopak přidán nejprve na apikální a poté na bazolaterální stranu. Buňky byly

pěstovány 21 až 25 dní, aby se vytvořila plně uzavřená monovrstva. Konečná výměna média byla 16 hodin před experimentem.

5.2.3 Měření integrity monovrstvy

Filtrační inserty s monovrstvou buněčné linie Caco-2 byly promyty 3x roztokem HBBS (Hanksův roztok vyvážené soli), který měl pH 7,4 a byl přehřátý na 37 °C. Aby byla zajištěna integrita buněčné bariéry, transepiteliální elektrický odpor (TEER) musel být alespoň 500 Ω. Dále byla přidána fluorescenční sloučenina Luciferova žluť v koncentraci 25 μM, kterou byla opět proveřena integrita buněčné monovrstvy.

Destičky byly po dobu 1 hodiny inkubovány při 37 °C, v atmosféře 5% CO₂ a za třepání (150 otáček/min). Následně byly měřeny ve čtečce Tecan Infinite M200 (vlnová délka excitace/ emise 480 nm/530 nm). Byly použity všechny vložky s integritou vyšší než 95 %.

5.2.4 Metabolismus a absorpce testovaných sloučenin

Každý testovaný stilbenoid byl rozpuštěn v DMSO (Dimethylsulfoxid, Stříbrná Skalice, ČR) pro dosažení koncentrace 10 mg/ml. Inserty byly promyty 3x HBBS. Na apikální stranu bylo přidáno 500 μl roztoku stilbenoidů v koncentraci 20 μM a na bazolaterální stranu bylo přidáno 1000 ul HBSS. Vzorky z apikální strany (50 μl) byly odebrány okamžitě.

Destičky s inserty byly inkubovány na orbitální třepačce (150 otáček/min) v CO₂ inkubátoru (37 °C, atmosféra 5% CO₂). Vzorky z bazolaterální strany byly odebrány v časových bodech 0,5, 1, 1,5, 2, 3 a 4 hodiny. Odebraných 500 μl HBSS bylo nahrazeno 500 μl čerstvého HBSS. Nakonec byly vzaty vzorky z apikální strany a inserty byly třikrát promyty HBSS. Byla měřena TEER, aby se zajistilo, že nedochází k porušení integrity buněčné bariéry (> 500 Ω).

Pro vyhodnocení absorpce testovaných sloučenin byly buňky zředěny v čistém methanolu. Vzorky byly až do analýzy uchovávány při -80 °C.

5.2.5 LC/MS analýza

Stilbenoidy byly stanovovány pomocí LC-MS. Tento systém sestával z chromatografické jednotky UPLC Ultimate 3000 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) a Q-TOF Impact II od Bruker Daltonik. Použitá kolona: Kinetex 1.7 mm F5 100 Å 100x2.1 mm Phenomenex (Torrance, CA, USA). Jako mobilní fáze byla pro chromatografickou separaci použit systém s gradientovou elucí: voda s 0,1% kyseliny mravenčí (fáze A) a 100% methanol. Gradient začínal na 20% fáze B, poté lineárně rostl do 3 min na 50% B a dále na 100% B v 6 min a byl udržován konstantní až do 15 min. Následně byl během minuty podíl fáze B snížen zpět na výchozích 20% a systém byl 4 min ekvilibrován.

Vždy po 5 vzorcích byl prováděn nástřik technického blanku (ředící roztok voda:methanol s 1% kyselinou mravenčí) a po 10 vzorcích nástřik vzorku kontroly kvality (směs standardů o koncentraci 50 ng/ml). Další parametry jsou uvedeny v tabulce č: 3.

Tabulka č. 3: Chromatografické parametry a parametry hmotnostního spektrometru

Chromatografické parametry	
Teplota kolony	35 °C
Teplota autosampleru	10 °C
Nástřik	5 µl
Rychlost průtoku	0,2 ml/min.
Parametry hmotnostního spektrometru	
Parametry ionizačního zdroje	End plate offset: 500
Kalibrace	provedena na formiát sodný
Capilary	3 000 V
Tlak zmlžujícího plynu	0,3 Barů
Průtok sušícího plynu	4 l/min
Teplota zdroje	250 °C
Spektra snímána při frekvenci	1 Hz
Spektra měřena v rozsahu	500-1 500 m/z
Průběh měření v režimu	FullScan
Typ ionizace	Negativní mód

Pro kalibraci výchozích látek (oxyresveratrol, piceatannol a thunalben) byly připraveny ředící řady ze standardů. Vzorky byly měřeny ve třech biologických opakováních.

Parametry metody pro měření MS byly nastaveny v Otof Series 4.0, (Bruker Daltonik-Bremen, Německo) a Chromeleon Xpress (Thermo Fisher Scientific-Waltham, MA, USA). Pro tvorbu jednotlivých sekvencí a pro předběžné zpracování dat byl použit software HyStar verze 3.2 SR4. Pomocí software Metabolite Detect 2.0 SR 4 (Bruker Daltonik-Bremen, Německo) byla prováděna diferenční analýza spekter a chromatografů. Výstupní data byla zpracována programem DataAnalysis 4.3 (Bruker Daltonik-Bremen, Německo).

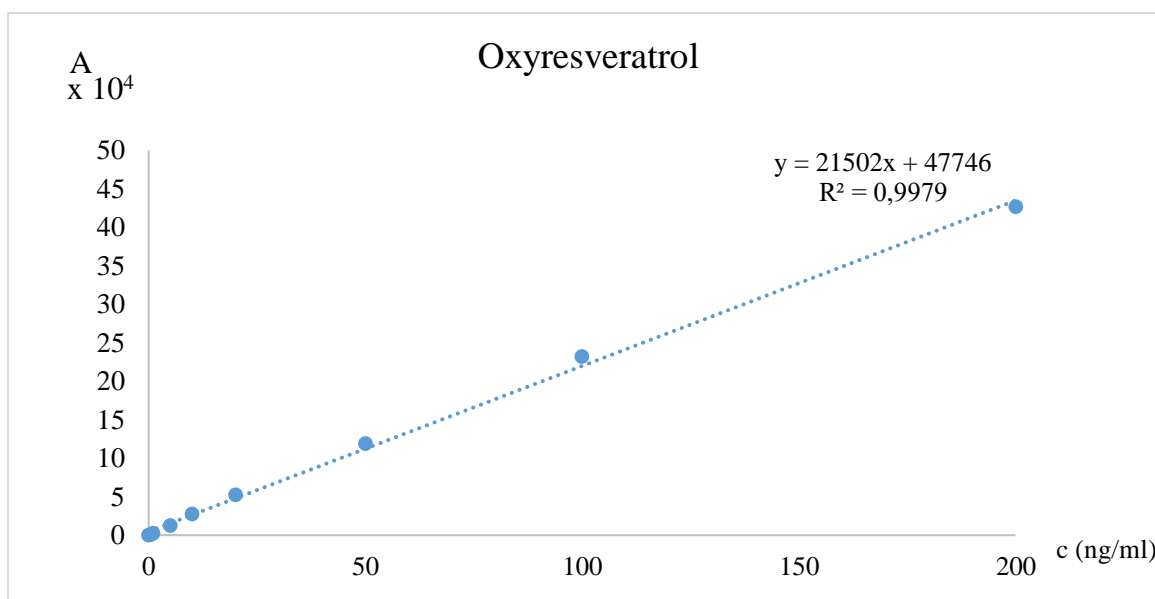
Statistika

Pro statistické vyhodnocení byl použit software Microsoft Excel 2016 a program Statistica 12 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Hodnoty byly vyjádřeny jako průměr a směrodatná odchylka ze tří nezávislých měření biologických replikátů. Kalibrační křivky byly zpracovány pomocí regresní analýzy.

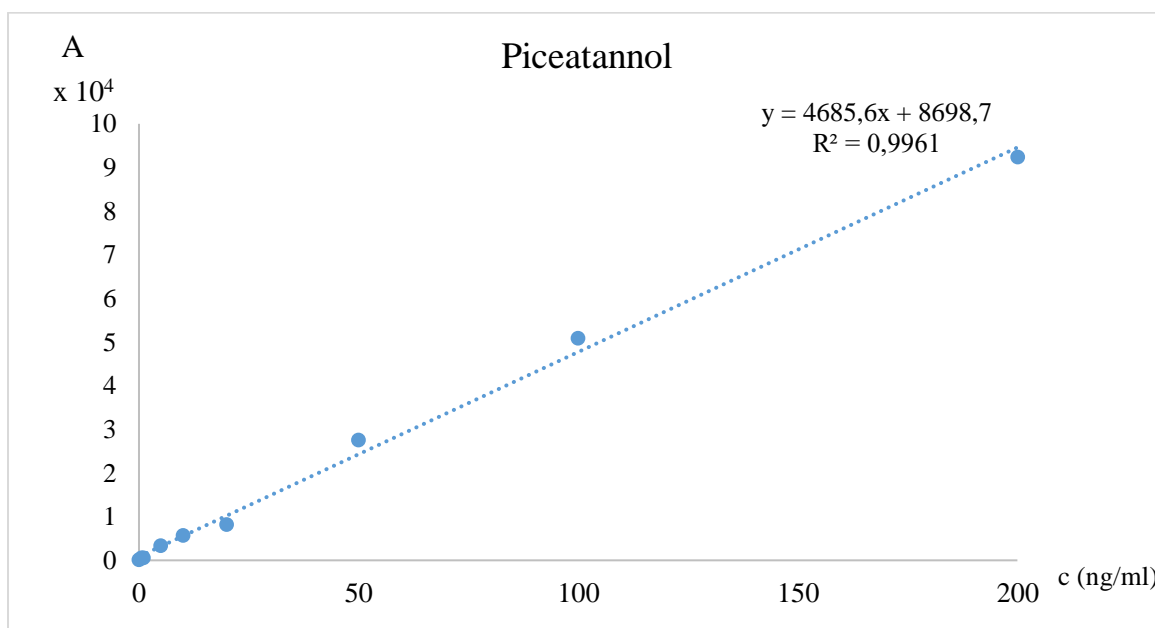
6 Výsledky

6.1 Validace metody stanovení

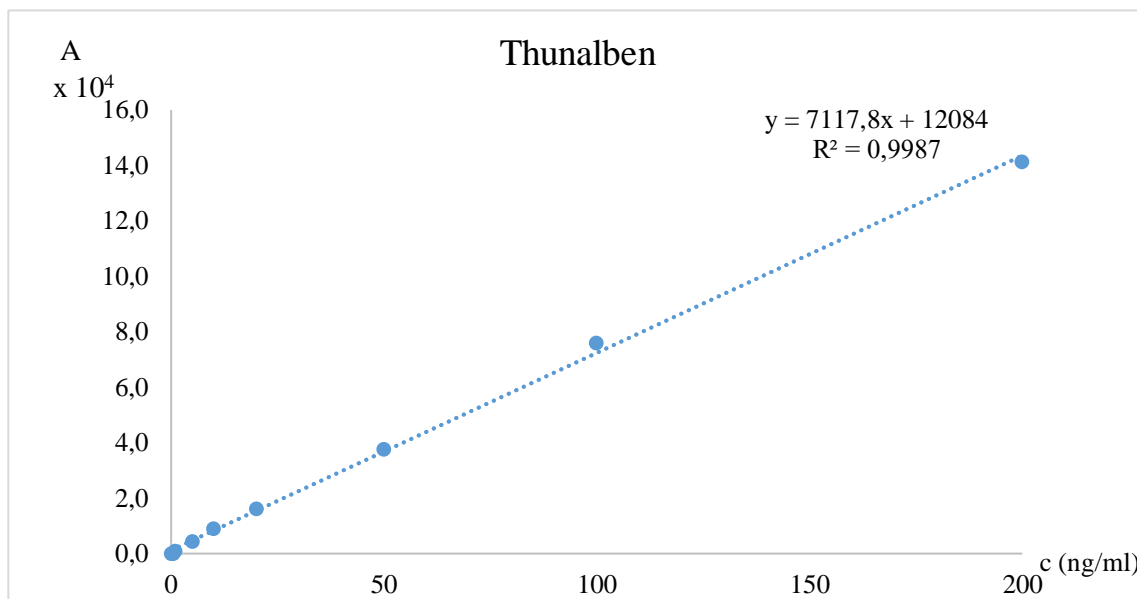
Permeabilita stilbenoidních látek byla zjišťována pomocí UPLC-Q-TOF. Pro zajištění spolehlivosti metody a kvantifikace zkoumaných látek byla použita kalibrační řada v rozpětí koncentrace (c) 0-200 ng/ml. Hodnota A vyjadřuje plochy píku v dané koncentraci. Kalibrační křivky jsou zobrazeny v následujících grafech č. 1-3. Linearita rostoucí koncentrace byla uspokojující.



Graf č. 1: Kalibrační křivka standardu oxyresveratrolu



Graf č. 2: Kalibrační křivka standardu picetannolu



Graf č. 3: Kalibrační křivka standardu thunalbenu

Limit detekce (LOD) byl spočítán jako poměr signálu k šumu 3:1. Hodnoty LOD se pohybovaly v rozmezí od 0,32 (OXY) do 1,14 (PIC) ng/ml. Limit kvantifikace (LOQ) byl vypočítán jako poměr signálu k šumu 10:1. Hodnoty LOQ se pohybovaly v rozmezí od 1,06 (OXY) - 3,81 (PIC) ng/ml. Validační parametry metod stanovení pro testované stilbenoidy jsou zobrazeny v následující tabulce č. 4.

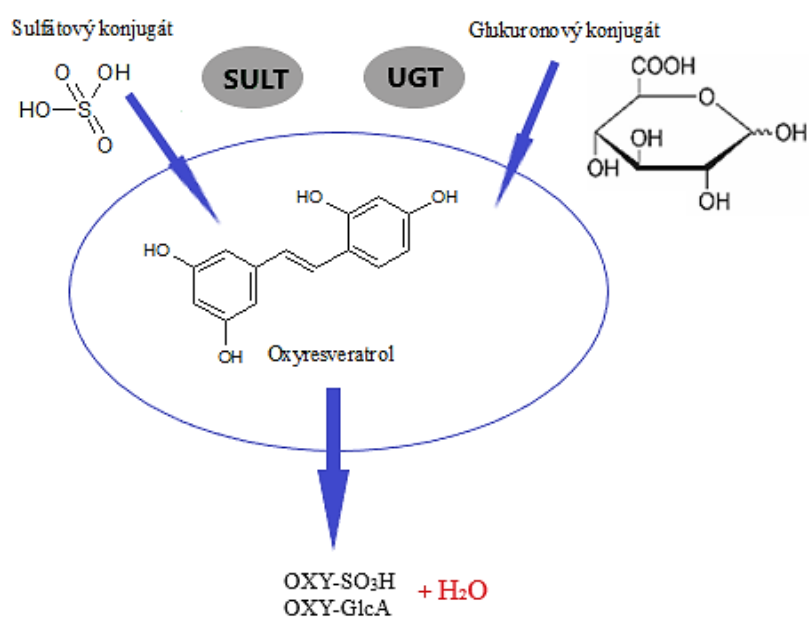
Tabulka č. 4: Validační parametry metod stanovení

Sloučenina	Rovnice kalibrační křivky	R ²	Lineární rozsah [ng/ml]	LOD [ng/ml]	LOQ [ng/ml]	Přesná hmotnost m/z [M-H] ⁻
OXY	$y = 21502x + 47746$	0,9979	0,5-200	0,32	1,06	243,0657
PIC	$y = 4685,6x + 8698,7$	0,9961	0,5-200	1,14	3,81	243,0657
THU	$y = 7117,8x + 12084$	0,9987	1-200	0,68	2,26	241,0865

R² koeficient determinace, LOD-limit detekce, LOQ-limit kvantifikace, m/z-poměr hmotnosti a náboje iontu OXY-oxyresveratrol, PIC-piceatannol, THU-thunalben

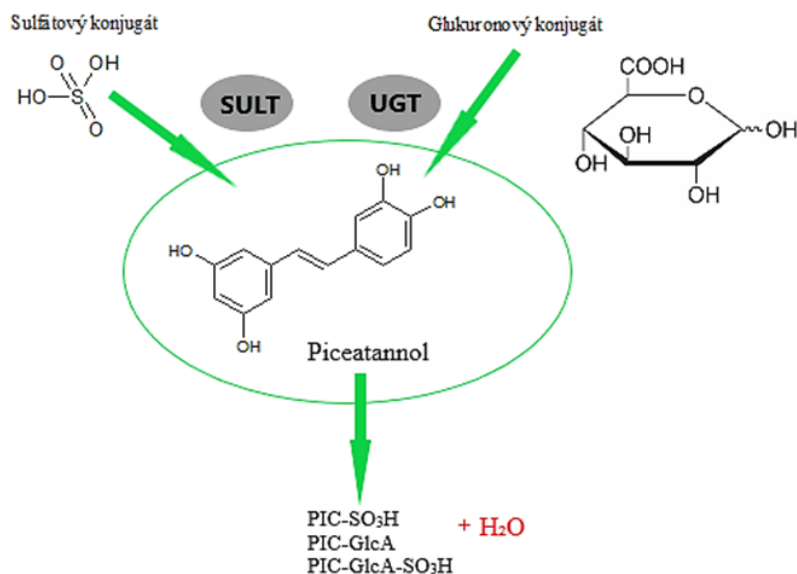
6.2 Metabolismus sledovaných stilbenů

V rámci této práce bylo zjištěno, že zkoumané stilbenoidy (oxyresveratrol, piceatannol a thunalben) byly v modelovém systému střevního epitelu metabolizovány především na sulfátové a glukuronové konjugáty. Glukuronizace zřejmě probíhala pomocí buněčných enzymů uridin-5 difosfoglukuronosyltransferáz (UGT) a sulfatace pomocí sulfotransferáz (SULT). Vzhledem k tomu, že konjugované skupiny se váží kondenzační reakcí s hydroxylovými skupinami daných látek, čemuž odpovídaly i naměřené hodnoty m/z, mohlo docházet k jejich vazbě na několik různých míst podle počtu hydroxylových skupin. Tím zřejmě vzniklo několik stereoizomerů o stejné molekulové hmotnosti, které se však často lišily svými retenčními časy, jak je patrné z chromatogramu sulfátovaného piceatanolu na obr. č. 11.

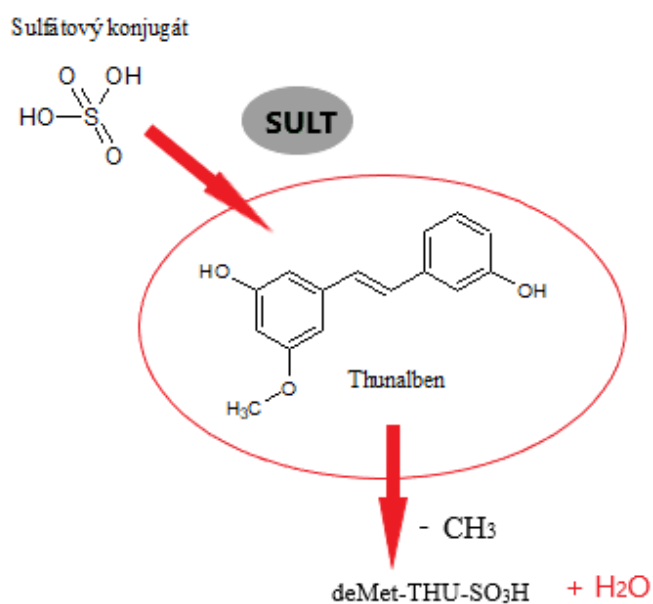


Obrázek č. 8: Sulfátové a glukuronové konjugáty oxyresveratrolu

Počet a typ vznikajících konjugátů se pro jednotlivé stilbenoidy lišily. Zatímco oxyresveratrol tvořil jak sulfátový (OXY-SO₃H), tak i glukuronový konjugát (OXY-GlcA) (viz obr. č. 8). U piceatannolu byla škála vzniklých produktů bohatší. Jak naznačuje následující obrázek č. 9, piceatannol kromě glukuronového (PIC-GlcA) a sulfátového (PIC-SO₃H) konjugátu tvořil i kombinovaný konjugát piceatannol-glukuronid-sulfát (PIC-GlcA-SO₃H). Zde tedy došlo k navázání jak glukuronidu, tak i sulfátu.

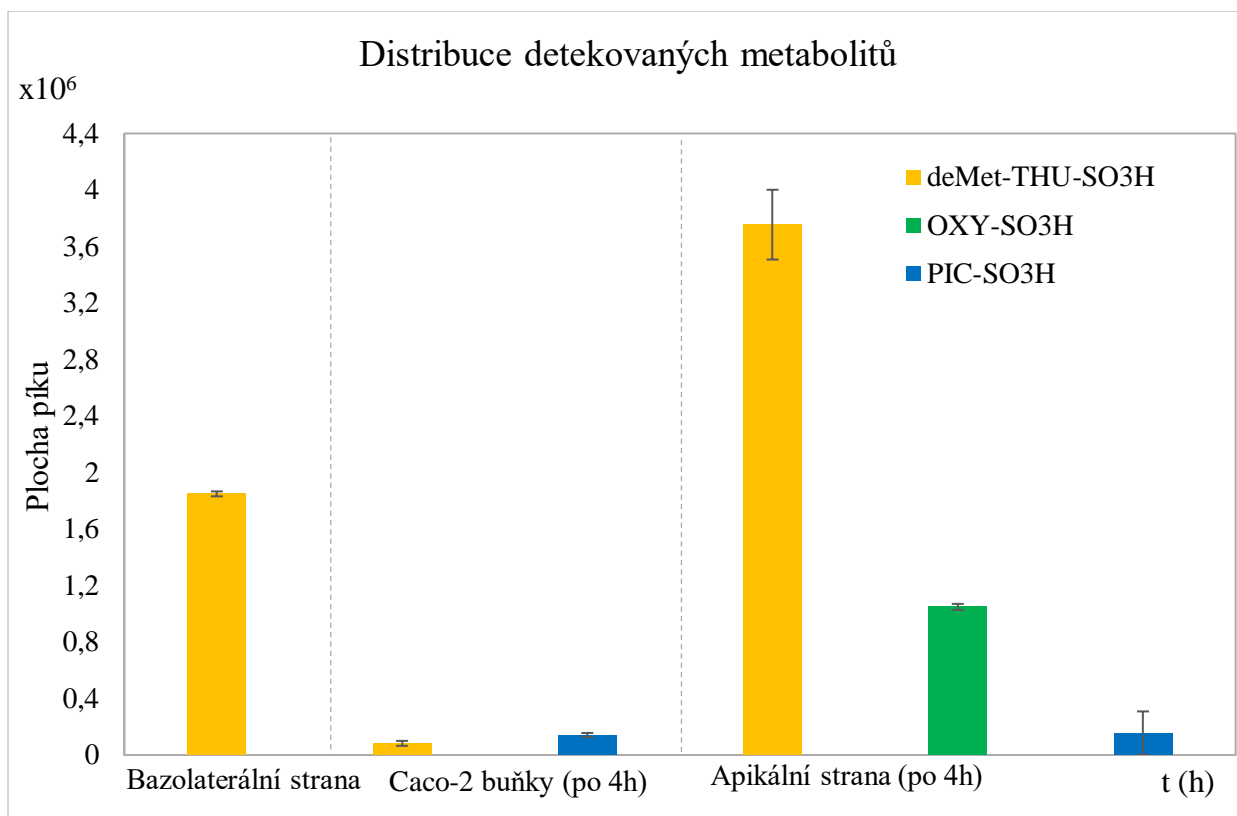


Obrázek č. 9: Sulfátové a glukuronové konjugáty piceatannolu



Obrázek č. 10: Sulfátový konjugát tunalbenu

U thunalbenu byla situace ještě komplikovanější. Po analýze chromatografických spekter jsme došli k závěru, že u thunalbenu docházelo v průběhu kultivace zřejmě ke ztrátě methylové skupiny a zároveň ke konjugaci se sulfátem. Tomuto produktu odpovídá zjištěná přesná molekulová hmotnost i typické ionty fragmentačního spektra (viz obr. 12). Jde tedy nejspíše o demetylovaný sulfát thunalbenu (detMet-THU-SO₃H). S glukuronidem tento metabolit nereagoval, glukuronovaný konjugát nebyl nalezen ani ve stopovém množství. Byl tedy pod limitem detekce.



t-čas, OXY-oxyresveratrol, PIC-piceatannol, THU-thunalben, GlcA-glukuronid, SO₃H-sulfát, deMet-demetylovaný konjugát

Graf č. 4: Distribuce detekovaných metabolitů v permeability assay po 4 hodinách experimentu

Metabolity detekované ve významném množství jsou zobrazeny v grafu č. 4. Z bazolaterální strany byly vzorky odebrány v časech 0.5, 1, 2.5, 2, 3 a 4 h. V těchto časech jsme detekovali pouze jediný konjugát. Byl to neznámý konjugát thunalbenu. Jeho zastoupení na bazolaterální straně je vyjádřeno jako součet koncentrací jednotlivých odběrů v daných časech. Po podrobné analýze jsme došli k závěru, že jde nejspíše o demetylovaný sulfát thunalbenu (deMet-THU-SO₃H). Tato látka nebyla předmětem této práce. Je však na místě ji zmínit, neboť byla detekována v relativně vysokých koncentracích ve všech oblastech modelu Caco-2.

Po 4 hodinách byly odebrány vzorky také z buněk a apikální strany. Po promytí buněk methanolem byly následně v buňkách detekovány pouze dva konjugáty, již výše zmíněný deMet-THU-SO₃H a sulfátový konjugát piceatannolu (PIC-SO₃H).

Na apikální straně opět dominoval konjugát deMet-THU-SO₃H. Dále zde byly ve vysokých koncentracích nalezeny sulfátové konjugáty piceatannolu (PIC-SO₃H) a oxyresveratrolu (OXY-SO₃H).

Tabulka č. 6: Přehled všech detekovaných metabolitů a jejich konjugátů

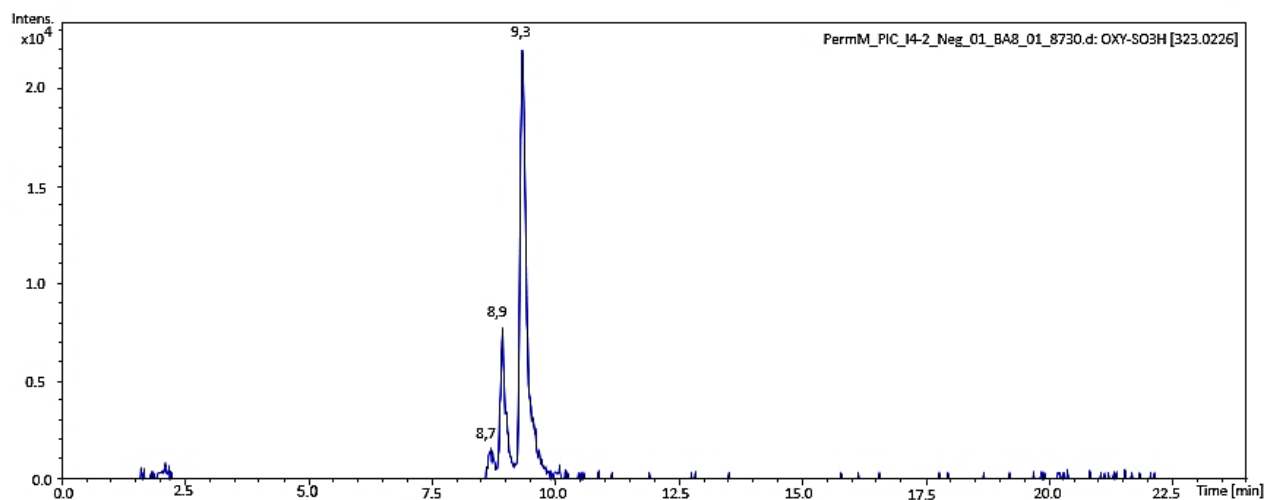
	RT (min)	m/z nalezená	m/z spočítaná	Sumární vzorec	Lokalizace
OXY	8,8	243.066	244.0736	C ₁₄ H ₁₂ O ₆	api*, buňky*
OXY-SO ₃ H	8,6	323.023	324.0304	C ₁₄ H ₁₂ O ₇ S	api, buňky*
OXY GlcA	8,3	419.098	420.1057	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₀	api, baz*, buňky*
PIC	9,5	243.066	244.0736	C ₁₄ H ₁₂ O ₄	-
PIC-SO ₃ H	8,7	323.023	324.0304	C ₁₄ H ₁₂ O ₇ S	api, buňky
	8,9				
	9,3				
	9,5				
PIC-GlcA	9,4	419.098	420.1057	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₀	api, buňky*
PIC-GlcA-SO ₃ H	8,2	499.055	500.0625	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₃ S	Api
	9,0				
THU	11,0	241.087	242.0943	C ₁₅ H ₁₄ O ₃	-
detMet-THU-SO ₃ H	10,7	307.027	307.0237	C ₁₇ H ₇ O ₆ S	api, baz, buňky

OXY-oxyresveratrol, PIC-piceatanonol, THU-thunalben, GlcA-glukuronid, SO₃H-sulfát, deMet-demetylovaný konjugát, api-apikální, baz-bazolaterální, RT-retenciční čas, m/z-poměr hmotnosti a náboje iontu, *stopové množství

Některé látky byly detekovány ve velmi malém množství. Je však důležité zmínit i ty, které byly zaznamenány alespoň ve stopovém množství. Tabulka č.6 tedy vypovídá o všech detekovaných metabolitech a jejich konjugátech v tomto experimentu. Pokud byly látky detekovány alespoň nad limitem detekce, je zde uvedena i lokalizace konjugátů.

V nízkých koncentracích, ale nad limitem detekce, byly na apikální straně ještě nalezeny glukuronové konjugáty oxyresveratrolu (OXY-GlcA) a piceatannolu (PIC-GlcA). U piceatannolu, zde byl detekován i další konjugát, piceatannol glukuronid-sulfát (PIC-GlcA-SO₃H), u kterého tedy došlo zároveň ke glukuronizaci i k sulfataci.

V tabulce č. 7 jsou dále uvedeny retenční časy jednotlivých molekul. Pro všechny byla vypočítána m/z. Při porovnání s m/z námi nalezenou, jsou tyto výsledky uspokojivé a můžeme říci, že se jedná právě o tyto molekuly.

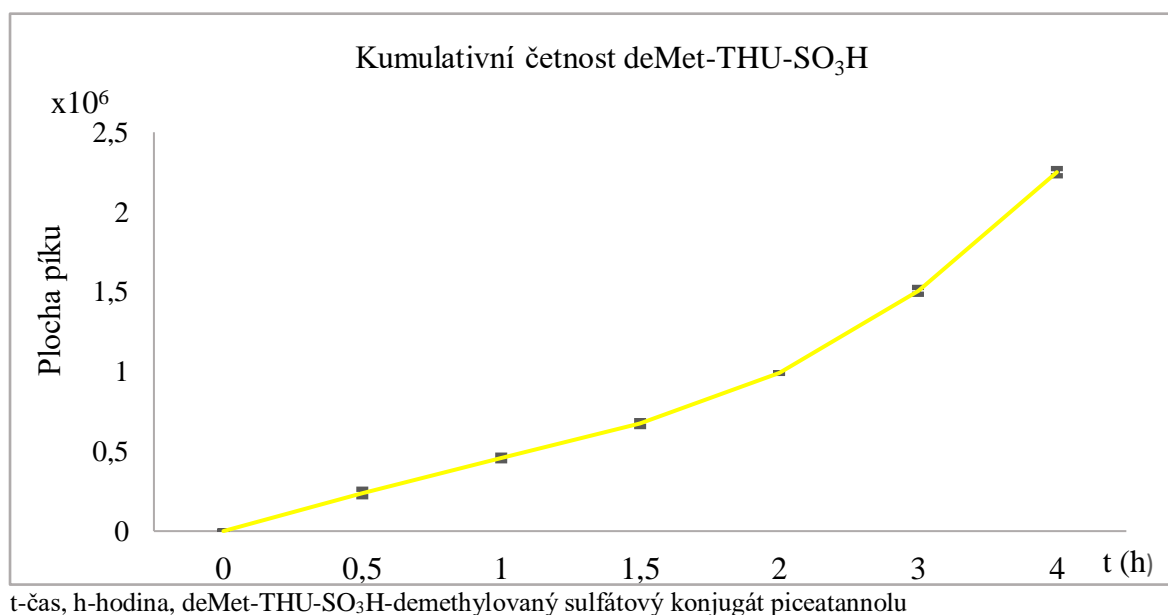


Obrázek č. 11: Chromatogram: Piceatannol-SO₃H (apikální strana)

Sulfátový konjugát piceatannolu (PIC-SO₃H) byl v buňkách detekován jako dva píky a na apikální straně dokonce jako píky tři (Obr. č. 11). Z toho vyplývá, že byl sulfát pokaždé navázaný na jinou hydroxylovou skupinu původního piceatannolu. To se odrazilo na retenčních časech jednotlivých molekul, zatímco molekulární hmotnost zůstala stejná.

Retenční časy jednotlivých izomerních forem PIC-SO₃H na apikální straně byly 8,7, 8,9 a 9,3 min. Signál píku v retenčním čase 8,7 min. byl na hranici detekce. K obdobnému rozdělení na více píků docházelo u tohoto sulfátového konjugátu i ve vzorku extraktu z Caco-2 buněk. Retenční časy molekul PIC-SO₃H detekované v buňkách byly 8,9. a 9,5 min.

Jak je uvedeno v tabulce č. 7, i u konjugátu piceatannolu glukuronid-sulfátu (PIC-GlcA-SO₃H) byly detekovány dvě molekuly s navázaným glukuronidem a sulfátem na odlišných pozicích, tzn. v odlišných retenčních časech (RT 8,2 a 9,0 min.).

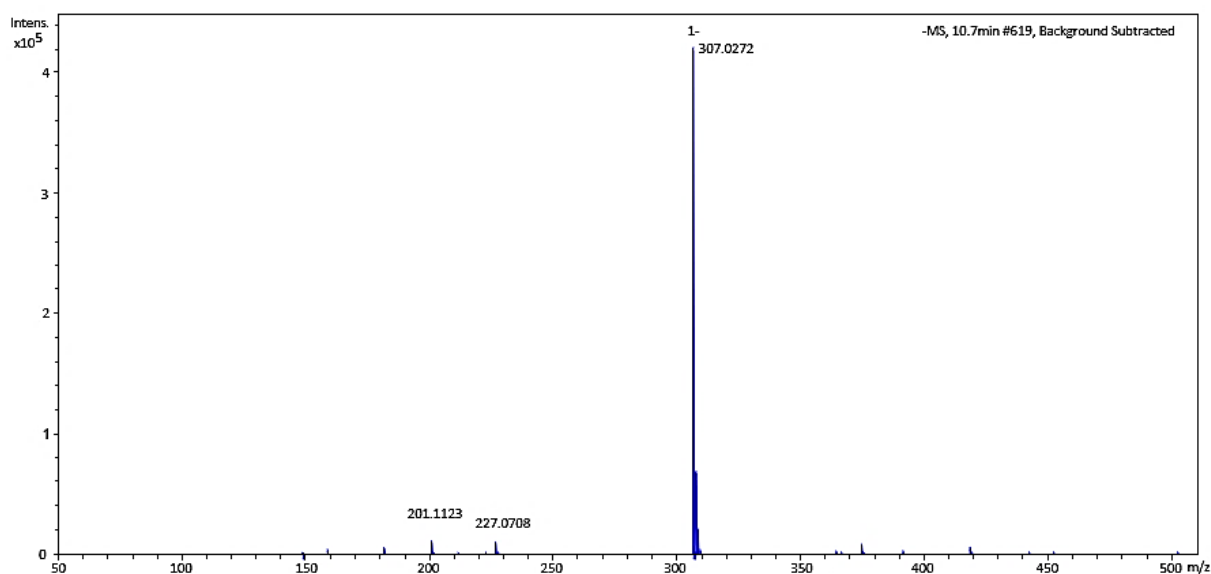


Graf č. 5: Kumulativní četnost konjugátu deMet-THU-SO₃H

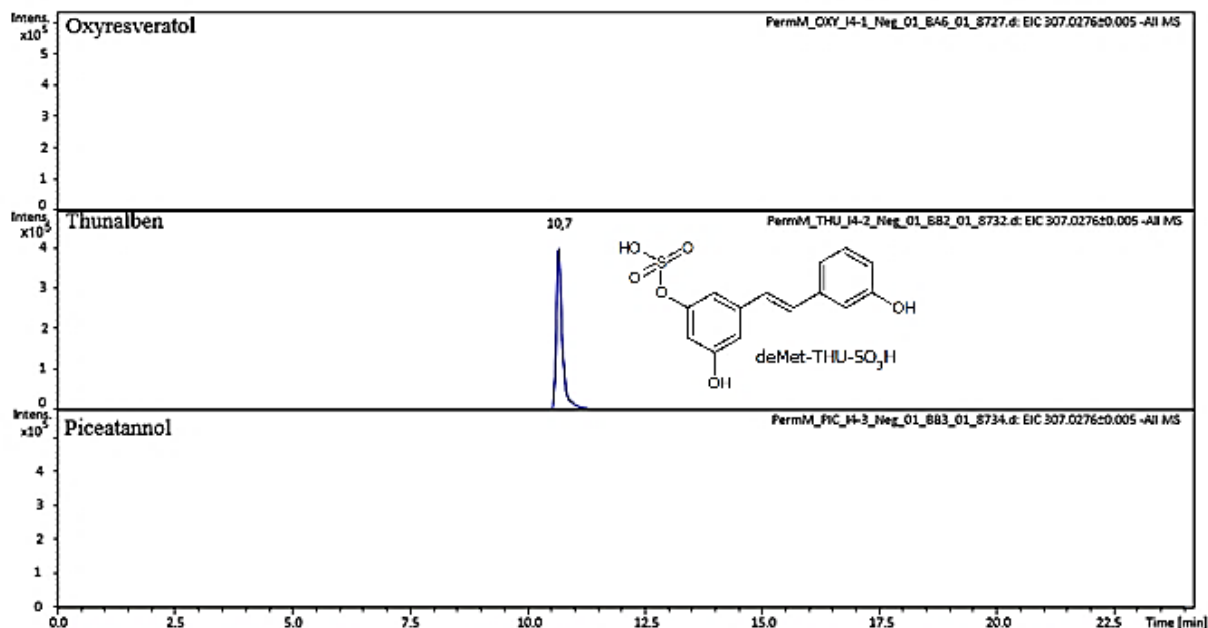
Demetylovaný sulfátový konjugát thunalbenu (DeMet-THU-SO₃H) byl jako jediný konjugát, který se kumuloval v buňkách. Na základě získaných dat bylo možné zpracovat kumulativní četnosti v daných čase, kdy byly vzorky odebrány. Tato kumulativní křivka svědčí o tom, že nedocházelo k velkým výkyvům v koncentracích mezi jednotlivými odběry v určitéch časech.

6.3 Identifikace demetylovaného SO₃H-konjugátu thunalbenu

Při ošetření buněk thunalbenem jsme detekovali neznámou látku s m/z 307,0237 (obr. č. 12). Po analýze chromatogramů a hmotnostních spekter jsme došli k závěru, že jde nejspíše o demetylovaný sulfát thunalbenu (detMet-THU-SO₃H). Na tuto látku jsme se v rámci této práce primárně nezaměřovali, neboť jsme předpokládali především vznik konjugátů pouze s glukuronidem či sulfátem. Zde však navíc krom sulfatace docházelo i k demethylaci původního thunalbenu. Nicméně tento produkt byl pro metabolismus thunalbenu zřejmě významný, protože odezva signálu (plocha píku) tohoto analytu byla poměrně intenzivní a byla detekována ve všech měřených frakcích modelu Caco-2. Data z MS/MS spekter (obr. č. 12) doplňuje i následující obrázek č. 13.



Obrázek č. 12: MS/MS spektrum nově detekovaného deMet-THU-SO₃H



Obrázek č. 13: Porovnání jednotlivých dat z apikální strany všech 3 metabolitů

Na obrázku č. 13 je zobrazeno porovnání signálů pro tuto m/z apikální strany ze všech odebraných vzorků námi testovaných stilbenoidů. Z jejich porovnání je zřejmé, že tento konjugát vznikl pouze u thunalbenu. Nejde tedy například o jinou molekulu či fragment, který by byl společný všem těmto stilbenoidům nebo o kontaminaci z analytického systému (kolona, autosampler).

7 Diskuze

Ve své práci se pomocí modelu Caco-2 permeability assay zabývám simulací střevního metabolismu *in vitro* vybraných metabolitů resveratrolu a jejich konjugátů. Touto metodou byla nastíněna dynamika vstřebávání a transformace oxyresveratrolu, piceatannolu a thunalbenu.

V průběhu experimentu byl z původních metabolitů resveratrolu detekován pouze oxyresveratrol. Piceatannol a thunalben byly detekovány až jako metabolity v konjugovaných formách. Na základě tohoto nálezu se domnívám, že látky nejsou v kultivačním médiu zcela stabilní. Nález těchto konjugátů dále naznačuje, že při experimentu docházelo k tvorbě jejich polymerních forem, které byly následně během kultivace metabolizovány. Vzniklé konjugáty identifikovaných skupin (např. SO₃H) byly pravděpodobně schopny nadále zabránit další polymerizaci.

Metabolity tvořily konjugáty se sulfátem nebo s glukuronovou kyselinou. V případě piceatannolu-glukuronid-sulfátu však docházelo ke glukuronizaci a sulfataci současně. Předpokládáme, že všechny tyto konjugace metabolitů probíhaly v buňkách pomocí sulfotransferáz (SULT) a glukuronosyltransferáz (UGT). Naši teorii potvrzuje i studie Wang L. et al. (2019), ve které lokalizační analýza ukázala, že sulfotransferázy jsou exprimovány v cytoplazmě. Pro UGT to bylo potvrzeno například ve studii Siissalo et al. (2008).

Sulfátové konjugáty námi zkoumaných metabolitů byly detekovány v mnohem větších koncentracích než glukuronové. Zároveň byly v relativně vysokých koncentracích nalezeny jak na apikální a bazolaterální straně, tak i v buňkách. Glukuronové konjugáty byly detekovány na apikální straně jen v nízkých koncentracích a na bazolaterální straně a v buňkách byly detekovány pouze ve stopovém množství. Studie Ung & Nagar (2007) také potvrzuje naše zjištění, že metabolity resveratrolu, po vstřebání do enterocytů, podléhají konjugaci především se sulfátem. Autoři této studie dále uvádějí, že SULT1A1 je hlavní enzym zodpovědný za přenos sulfátové skupiny na hydroxylovou skupinu ve fenolických sloučeninách. Studie Kaldas et al. (2003) také potvrzuje naši hypotézu, že sulfátová konjugace je hlavní cestou metabolitů resveratrolu v buňkách Caco-2. A dodává, že by to tak mohlo být i *in vivo*.

Oxyresveratrol

Samotný oxyresveratrol byl po 4 hodinách detekován na apikální straně i v buňkách. Toto množství bylo však stopové. Dále jsme detekovali sulfátové a glukuronidové konjugáty oxyresveratrolu, viz tabulka č. 7. Sulfátový konjugát (OXY-SO₃H) byl ve vysoké koncentraci detekován na apikální straně. Glukuronový konjugát oxyresveratrolu (OXY-GlcA) byl v nízké koncentraci detekován na apikální straně a jeho stopové množství bylo detekováno v buňkách a na bazolaterální straně. Tomu však nepřikládáme velký význam.

Oxyresveratrol a jeho konjugáty by tedy mohly působit hlavně v oblasti enterocytů a chránit tak střevní stěnu před mykotoxiny a jinými patogenními látkami. S tímto názorem se ztotožňuje i studie Wan et al. (2018), kde zjistili, že oxyresveratrol může pronikat

do cytoplazmy, příznivě modulovat enzymy (na regulaci exprese genů, mitózy, apoptózy aj.), a být tak účinný v posílení střevní bariéry a ochraně proti poškození střev.

Piceatannol

U piceatannolu byly detekovány pouze jeho konjugované formy. Důvodem, proč nebyla nalezena mateřská sloučenina, může být jeho případná transformace na vyšší polymery, která však nebyla předmětem experimentu. Glukuronový konjugát (PIC-GlcA) byl detekován v nízké koncentraci na apikální straně. Ve stopovém množství byl nalezen i v buňkách a na bazolaterální straně.

Sulfátový konjugát piceatannolu (PIC-SO₃H) byl detekován jak na apikální straně, tak v buňkách. Jak je již zmíněno v tabulce č. 7, na apikální straně se signál pro tento produkt vyskytoval jako 3 oddělené píky a v extraktu z buněk pak jako 2, odpovídající zřejmě rozdílným pozicím vazby sulfátu na hydroxyly piceatannolu, stejně jako to bylo dříve popsáno u příbuzných látek, např. resveratrolu (Jarosova et al., 2018). Různá intenzita signálu svědčí patrně o preferenci některých hydroxylových skupin enzymy SULT při konjugační reakci. Retenční časy všech analytů jsou zobrazeny v tabulce č. 7. V tomto množství, ve kterém byl PIC-SO₃H detekován, jsou pravděpodobné biologické účinky nejen na apikální straně odpovídající lumen střeva, ale i uvnitř enterocytů.

Ve studii Brents et al. (2012) bylo zjištěno, že substituce OH skupiny sulfátem či glukuronidem zvýšila antiproliferativní a antiangiogenní vlastnosti piceatannolu. Je tedy možné, že strukturální modifikace piceatannolu zvyšuje jeho biologickou dostupnost, což vede ke zvýšené biologické aktivitě.

Thunalben

Přímé konjugáty thunalbenu nebyly v této studii pozorovány. Jedním z možných důvodů by mohl být nižší počet volných hydroxylových skupin ve srovnání s ostatními testovanými látkami. Ve studii Wan et al. z roku 2018 bylo zjištěno, že sloučeniny s menším počtem hydroxylových skupin mají zpravidla i nižší bioaktivitu. Nicméně hlavním důvodem by mohla být přítomnost methylové skupiny na jednom z hydroxylů, která by mohla bránit enzymatické konjugaci thunalbenu.

Jako jeho hlavní produkt byl detekován konjugát s *m/z* 307,0237. Po analýze chromatogramů a hmotnostních spekter jsme došli k závěru, že jde nejspíše o demetylovaný sulfát thunalbenu (detMet-THU-SO₃H). Největší množství deMet-THU-SO₃H bylo detekováno na apikální straně a jde celkově o největší zaznamenané množství ze všech detekovaných konjugátů. Jde také o jediný konjugát detekovaný na bazolaterální straně, kde byl nalezen i ve všech časech. Na základě toho jsme byli schopni vypracovat kumulativní četnost (graf č. 5), která poukazuje na relativně rovnoměrné kumulování tohoto konjugátu v buňkách. Což naznačuje, že má thunalben, resp. jeho produkt, potenciál v biologické aktivitě. Proto pokládáme za prospěšné zabývat se touto látkou i v dalších studiích.

Ve studii Dietrich et al. (2003) bylo zjištěno, že resveratrol a jeho metabolity mají po absorpci a konjugaci dvě cesty. Buď mohou být transportovány zpět přes apikální membránu a dosáhnout oblasti střevního lumenu nebo mohou projít dál přes bazolaterální

membránu a vstupovat tak do krevního řečiště, případně do enterohepatálního oběhu. Ve studii Kaldas et al. (2003) doplňují tuto skutečnost o poznatky ohledně transportu těchto konjugátů. Bylo zjištěno, že konjugáty, především sulfátové, jsou transportovány na apikální stranu hlavně pomocí transportéru MRP2. Naopak MRP 3 a 4 transportéry jsou zodpovědné za transport konjugátů na bazolaterální stranu.

Naše výsledky korespondují se závěry předešlých studií (Dietrich et al. 2003 a Kaldas et al. 2003). U námi zkoumaných látek docházelo k oběma těmto cestám. Jako konjugáty pronikající přes apikální membránu zpět do oblasti enterocytů byly vyhodnoceny všechny detekované konjugáty. Jejich působení bude tedy v oblasti enterocytů. V buňkách pak byly nalezeny pouze dva metabolity PIC-SO₃H a deMet-THU-SO₃H. Zde se dá předpokládat, že jejich další osud se bude odvíjet na základě působení buněčných enzymů. Tyto konjugáty budou pravděpodobně dále metabolizovány. DeMet-THU-SO₃H byl jako jediný nalezen i na bazolaterální straně. Z toho usuzujeme, že by mohl být významný z hlediska biologické aktivity *in vivo*, neboť se ze všech metabolitů zdá biologicky nejdostupnější. Nicméně studie o jeho aktivitě *in vitro* i *in vivo* doposud chybí.

8 Závěr

Cílem práce bylo stanovit dynamiku vstřebávání a transformace stilbenoidů v lidském tenkém střevě prostřednictvím Caco-2 permeability assay, a také zhodnotit vliv funkčních substituentů v molekule na tyto transformace. Výsledky naznačují, že jsou metabolity resveratrolu méně stabilní a je důležité dbát na rychlé zpracování, aby docházelo k co nejmenšímu rozsahu změn forem, např. k polymerizaci na vyšší struktury. Metabolismus těchto látek probíhal pravděpodobně v cytosolu buněk, kde docházelo k jejich sulfataci a glukuronidaci.

Byla testována hypotéza, že substituenty aromatických kruhů mohou měnit poměr vznikajících konjugátů v buňkách. Tato hypotéza byla potvrzena. Z hlediska vlivu substituentů v molekule na transformace stilbenoidů mají metabolity resveratrolu větší počet OH skupin, případně je mají ve výhodnějších pozicích. Tím se teoreticky zvyšuje i jejich samotná bioaktivita. Bohužel v této době není dostatek studií na biologickou dostupnost a bioaktivitu těchto metabolitů a jejich konjugátů. Nicméně výsledky této práce naznačují, že v důsledku účinné sulfátové konjugace, může být absorpce metabolitů resveratrolu *in vivo* vysoká.

Největší biologickou aktivitu vykazoval sulfátový konjugát piceatannolu, který byl detekován na apikální straně i v samotných Caco-2 buňkách. Dalším slibným konjugátem byl detMet-THU-SO₃H, který byl jako jediný detekován ve významném množství i na bazolaterální straně, tudíž by v intaktním organismu mohl být transportován přes střevní membránu do krevního řečiště.

Výsledky této studie se zdají být povzbudivé, neboť by tyto konjugáty mohly mít podobné účinky jako resveratrol nebo se podílet na biologických účincích, které byly dříve prisuzovány pouze jemu. Velice slibné se zdají být především jako přípravky na ochranu enterocytů a zajištění jejich správné funkce. Bohužel v současné chvíli chybí znalosti z oblasti transportu a metabolismu těchto látek dál v organismu. To by tedy mohlo být cílem dalších studií.

9 Literatura

- Berman A Y, Motechin R A, Wiesenfeld M Y, Holz M K. 2017. The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials. *Npj Precision Oncology* **1**.
- Bird J K, Raederstorff D, Weber P, Steinert R E. 2017. Cardiovascular and Antiobesity Effects of Resveratrol Mediated through the Gut Microbiota. *Advances in Nutrition: An International Review Journal* **8(6)**: 839–849.
- Bomba L, Minuti A, Moisés J M, Trevisi E, Eufemi E, Rossi F, Mazza R, Bertoni G, Looor J J, Ajmone-marsan P. 2014. Gut Response Induced by Weaning in Piglet Features Marked Changes in Immune and Inflammatory Response **14**: 657-671.
- Bravo L. 2009. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews* **56(11)**: 317–333.
- Brents L K, Medina-Bolivar F, Seely K A, Nair V, Bratton M, Opo-Olazabal L, Radominska-Pandya A. 2012. Natural prenylated resveratrol analogs arachidin-1 and -3 demonstrate improved glucuronidation profiles and have affinity for cannabinoid receptors. *Xenobiotica* **42(2)**:139–156.
- Brown V A, Patel K R, Viskaduraki M, Crowell J A, Perloff M, Booth T D, Brenner D E. 2010. Repeat dose study of the cancer chemopreventive agent resveratrol in healthy volunteers: Safety, pharmacokinetics, and effect on the insulin-like growth factor axis. *Cancer Research* **70(22)**: 9003–9011.
- Bujard A, Petit C, Carrupt P A, Rudaz S, Schappler J. 2017. HDM-PAMPA to predict gastrointestinal absorption, binding percentage, equilibrium and kinetics constants with human serum albumin and using 2 end-point measurements. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **97**: 143–150.
- Cao W, Dou Y, Li, A. 2018. Resveratrol Boosts Cognitive Function by Targeting SIRT1. *Neurochemical Research* **43(9)**: 1705-1713.
- Casamonti M, Piazzini V, Bilia A R, Bergonzi M C. 2019. Evaluation of Skin Permeability of Resveratrol Loaded Liposomes and Nanostructured Lipid Carriers using a Skin Mimic Artificial Membrane (skin-PAMPA)”, *Drug Delivery Letters* **9**: 134.
- Colica C, Milanović M, Milić N, Aiello V, De Lorenzo A, Abenavoli L. 2018. A systematic review on natural antioxidant properties of resveratrol. *Natural Product Communications* **13(9)**: 1195–1203.
- Derya O. 2008. Study of polyphenol content in the seeds of red grape (*Vitis vinifera* L.) varieties cultivated in Turkey and their antiradical activity **109**: 426–430.
- Deus C M, Serafim T L, Magalhães-Novais S, Vilaça A, Moreira A C, Sardão V A, Oliveira P J. 2017. Sirtuin 1-dependent resveratrol cytotoxicity and pro-differentiation activity on breast cancer cells. *Archives of Toxicology* **91(3)**: 1261–1278.
- Dhakal S, Kushairi N, Phan C W, Adhikari B. (n.d.). Dietary Polyphenols: A Multifactorial Strategy to Target Alzheimer’s Disease: 1–40.
- Dietrich C G, Geier A, Oude Elferink R P J. 2003. ABC of oral bioavailability: Transporters as gatekeepers in the gut. *Gut* **52(12)**: 1788–1795.
- Dou Z, Rong X, Zhao E, Zhang L, Lv Y. 2019. Neuroprotection of Resveratrol Against Focal Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury in Mice Through a Mechanism Targeting Gut-Brain Axis. *Cellular and Molecular Neurobiology* **39(6)**: 883–898.
- Dubrovina A S, Kiselev K V. 2017. Regulation of stilbene biosynthesis in plants. *Planta* **246(4)**: 597–623.

- Duthie G G, Pedersen M W, Gardner P T, Morrice P C, Jenkinson A M E, McPhail D B, Steele G M. 1998. The effect of whisky and wine consumption on total phenol content and antioxidant capacity of plasma from healthy volunteers. *European Journal of Clinical Nutrition* **52(10)**: 733–736.
- Ferreira J. 2014. Polyphenols and mitochondria: An update on their increasingly emerging ROS-scavenging independent actions **55**: 170-175
- Flamini R, De Rosso M. 2018. High-Resolution Mass Spectrometry and Biological Properties of Grapevine and Wine Stilbenoids. *Studies in Natural Products Chemistry*. 1st ed. Vol. 61. Elsevier B.V **61**: 175-210
- Fuhrman B, Volkova N, Suraski A, Aviram M. 2001. White Wine with Red Wine-like Properties : Increased Extraction of Grape Skin Polyphenols Improves the Antioxidant Capacity of the Derived White Wine: 3164–3168.
- Gambini J, Inglés M, Olaso G, Lopez-Grueso R, Bonet-Costa V, Gimeno-Mallench L, Borrás C. 2015. Properties of Resveratrol: *In vitro* and *In vivo* Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- Hoenig M P, Zeidel M L. 2014. Homeostasis, the milieu inte´rieur, and the wisdom of the nephron. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* **9(7)**: 1272–1281.
- Hoshino J, Park E J, Kondratyuk T P, Marler L, Pezzuto J M, Van Breemen R B, Cushman M. 2010. Selective synthesis and biological evaluation of sulfate-conjugated resveratrol metabolites. *Journal of Medicinal Chemistry* **53(13)**: 5033–5043.
- Huang L, Wang S, Ma F, Zhang Y, Peng Y, Xing C, Peng Y. 2018. From stroke to neurodegenerative diseases: The multi-target neuroprotective effects of 3-n-butylphthalide and its derivatives. *Pharmacological Research* **135**: 201–211.
- Hubatsch I, Ragnarsson E G E, Artursson P. 2007. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nature Protocols* **2(9)**: 2111–2119.
- Jarosova V, Duskocil I, Volstatova T, Havlik J. 2018. Adhesive Property of Different Strains of Lactobacilli in the Presence of Resveratrol. *Scientia Agriculturae Bohemica*.
- Jung C M, Heinze T M, Schnackenberg L K, Mullis L B, Elkins S A, Elkins A, ... Sutherland J B. 2009. Interaction of dietary resveratrol with animal-associated bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **297(2)**: 266–273.
- Kaldas M I, Walle U K, Walle T. 2003. Resveratrol transport and metabolism by human intestinal Caco-2 cells: 307–312.
- Kantartzis K, Fritsche L, Bombrich M, Machann J, Schick F, Staiger H, Kunz I. 2018. Effects of Resveratrol Supplementation on Liver Fat Content in Overweight and Insulin-Resistant Subjects: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial.” *Diabetes, Obesity and Metabolism* **20 (7)**: 1793–97.
- Kim D O, Lee K W, Lee H J, Lee C Y. 2002. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50(13)**: 3713–3717.
- Kim Y, Keogh J B, Clifton P M. 2016. Polyphenols and Glycemic Control: 2471.
- Kroon P A, Faulds C B, Ryden P, Robertson J A, Williamson G. 1997. Release of Covalently Bound Ferulic Acid from Fiber in the Human Colon. *Journal of*

- Agricultural and Food Chemistry **45(3)**: 661–667.
- Lennernäs H. 1998. Human intestinal permeability. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **87(4)**: 403–410.
- Lin L Z, Chen P, Harnly J M. 2008. New phenolic components and chromatographic profiles of green and fermented teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56(17)**: 8130–8140.
- Mayack B K, Sippl W, Kang F N. 2020. Natural Products as Modulators of Sirtuins.
- Moreira A S P, Nunes F M, Simões C, Maciel E, Domingues P, Domingues M R M, Coimbra, M A. 2017. Data on coffee composition and mass spectrometry analysis of mixtures of coffee related carbohydrates, phenolic compounds and peptides. *Data in Brief* **13**: 145–161.
- Most J, Penders J, Lucchesi M, Goossens G H, Blaak E E. 2017. Gut microbiota composition in relation to the metabolic response to 12-week combined polyphenol supplementation in overweight men and women. *European Journal of Clinical Nutrition* **71(9)**: 1040–1045.
- Murias M, Handler N, Erker T, Pleban K, Ecker G, Saiko P, Jäger W. 2004. Resveratrol analogues as selective cyclooxygenase-2 inhibitors: Synthesis and structure-activity relationship. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **12(21)**: 5571–5578.
- Nicholson S K, Tucker G A, Brameld J M. 2008. Effects of dietary polyphenols on gene expression in human vascular endothelial cells. *Proceedings of the Nutrition Society*, **67(1)**: 42–47.
- Ovaskainen M, To R, Koponen J M, Sinkko H, Hellstro J. 2018. Dietary Intake and Major Food Sources of Polyphenols in Finnish Adults: 1 – 3.
- Pérez-Jiménez J, Neveu V, Vos F, Scalbert A. 2010. Systematic analysis of the content of 502 Polyphenols in 452 foods and beverages: An application of the phenol-explorer database. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58(8)**: 4959–4969.
- Pietta P, Minoggio M, Bramati L. 2003. Plant polyphenols: Structure, occurrence and bioactivity. *Studies in Natural Products Chemistry* **28**: 257–312.
- Portmann S, Fahrner R, Lechleiter A, Keogh A, Overney S, Laemmle A, Stroka D. 2013. Antitumor effect of SIRT1 inhibition in human HCC tumor models *in vitro* and *in vivo*. *Molecular Cancer Therapeutics* **12(4)**: 499–508.
- Poudel R, Stanley J L, Rueda-clausen C F, Andersson I J, Sibley, C P, Davidge S T, Baker P N. 2013. Effects of Resveratrol in Pregnancy Using Murine Models with Reduced Blood Supply to the Uterus **8(5)**: 1–7.
- Reinisalo M, Kårlund A, Koskela A, Kaarniranta K, Karjalainen R O. 2015. Polyphenol stilbenes: Molecular mechanisms of defence against oxidative stress and aging-related diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- Rothwell J. A. Perez-Jimenez J. Neveu V, Medina-Remón A, M’Hiri N, García-Lobato P, Scalbert A. 2013. Phenol-Explorer 3.0: A major update of the Phenol-Explorer database to incorporate data on the effects of food processing on polyphenol content: 1–8.
- Rozehnal V, Nakai D., Hoepner U, Fischer T, Kamiyama E, Takahashi M, Mueller J. 2012. Human small intestinal and colonic tissue mounted in the Ussing chamber as a tool for characterizing the intestinal absorption of drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **46(5)**: 367–373.
- Scalbert A. Williamson G. 2000. Bioavailability of Polyphenols. *Journal of Nutrition*: 2073–2085.
- Serra D, Almeida L M, Dinis T C P. 2018. Dietary polyphenols: A novel strategy to modulate microbiota-gut-brain axis. *Trends in Food Science and Technology* **78**: 224–233.

- Schwager J, Richard N, Widmer F, Raederstorff D. 2017. Resveratrol Distinctively Modulates the Inflammatory Profiles of Immune and Endothelial Cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **17** (1): 1–12.
- Siissalo S, Zhang H, Stilgenbauer E, Kaukonen A M, Hirvonen J, Finel M. 2008. The expression of most UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) is increased significantly during Caco-2 cell differentiation, whereas UGT1A6 is highly expressed also in undifferentiated cells. *Drug Metabolism and Disposition* **36**(11): 2331–2336.
- Singleton V L, Rossi J A J. 1965. Colorimetry to total phenolics with phosphomolybdic acid reagents. *American Journal of Enology and Viniculture* **16**(48): 144–158.
- Taguchi C, Fukushima Y, Kishimoto Y, Suzuki-Sugihara N, Saita E, Takahashi Y, Kondo K. 2015. Estimated dietary polyphenol intake and major food and beverage sources among elderly Japanese. *Nutrients* **7**(12): 10269–10281.
- Tremel J, Leřáková V, Šmejkal K, Paulíčková T, Labuda Š, Granica S, Hošek J. 2019. Antioxidant activity of selected stilbenoid derivatives in a cellular model system. *Biomolecules* **9**.
- Ung D, Nagar S. 2007. Variable sulfation of dietary polyphenols by recombinant human sulfotransferase (SULT) 1A1 genetic variants and SULT1E1. *Drug Metabolism and Disposition* **35**(5): 740–746.
- Vos F, Crespy V, Chaffaut L, Mennen L, Knox C, Neveu V. 2010. Original Article Phenol-Explorer : an online comprehensive database on polyphenol contents in foods, 2010, 1–9.
- Wahdan S A, Azab S S, Elsherbiny D A, El-Demerdash E. 2019. Piceatannol protects against cisplatin nephrotoxicity via activation of Nrf2/HO-1 pathway and hindering NF-κB inflammatory cascade. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, **392**(11): 1331–1345.
- Walle T. 2011. Bioavailability of resveratrol. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1215**(1): 9–15.
- Wan M L Y, Ling K H, El-Nezami H, Wang M. 2018. Oxyresveratrol protective effects against deoxynivalenol-induced intestinal barrier dysfunction and bacterial translocation on porcine intestinal epithelial IPEC-J2 cells. *Journal of Food Bioactives* **1**: 116–123.
- Wang L, Liu X, Wang X, Pan Z, Geng X, Chen B, Song X. 2019. Identification and characterization analysis of sulfotransferases (SOTs) gene family in cotton (*Gossypium*) and its involvement in fiber development. *BMC Plant Biology* **19**(1): 1–13.
- Wang N, He J, Pan C, Wang J, Ma M, Shi X, Xu Z. 2019. Resveratrol Activates Autophagy via the AKT/mTOR Signaling Pathway to Improve Cognitive Dysfunction in Rats With Chronic Cerebral Hypoperfusion. *Frontiers in Neuroscience* **13**: 1–14.
- Wang P, Sang S. 2018. Metabolism and pharmacokinetics of resveratrol and pterostilbene. *BioFactors* **44**(1).
- Wang W, Wang S, Liu T, Ma Y, Huang S, Lei L, Ding Y. 2020. Resveratrol: Multi-Targets Mechanism on Neurodegenerative Diseases Based on Network Pharmacology. *Frontiers in Pharmacology*, **11**.
- Xu J J, Wang Y J, Li Y P. 2019. Phenolic Compounds from *Thunia alba* and Their Inhibitory Effects on Nitric Oxide Production. *Chemistry of Natural Compounds* **55**(3):560–562.
- Xu W, Lu Y, Yao J, Li Z, Chen Z, Wang G, Tian X. 2014. Novel role of resveratrol: Suppression of high-mobility group protein box 1 nucleocytoplasmic translocation by the upregulation of sirtuin 1 in sepsis-induced liver injury. *Shock* **42**(5): 440–447.

- Yang H, Baur J A, Chen A, Miller C, Sinclair D A. 2007. Design and synthesis of compounds that extend yeast replicative lifespan. *Aging Cell* **6(1)**: 35–43.
- Yu H, Wang Q, Sun Y, Shen M, Li H, Duan Y. 2015. A new PAMPA model proposed on the basis of a synthetic phospholipid membrane. *PLoS ONE*, **10(2)**: 1–13.
- Yu S, Zhou X, Xiang H, Wang S, Cui Z, Zhou J. 2019. Resveratrol reduced liver damage after liver resection in a rat model by upregulating sirtuin 1 (SIRT1) and inhibiting the acetylation of high mobility group box 1 (HMGB1). *Medical Science Monitor* **25**: 3212–3220.
- Zhang Y, Li Y, Wang Y, Wang G, Mao L, Zhang D, Wang, J. 2019. Effects of resveratrol on learning and memory in rats with vascular dementia. *Molecular Medicine Reports* **20(5)**: 4587–4593.
- Zloch Z, Sedláček P, Langmajerová J, Müllerová D. 2018. Intake and Profile of Plant Polyphenols in the Diet of the Czech Population. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* **68(1)**: 57–62.

10 Seznam použitých zkratek

AFAP1L2- Actin Filament Associated Protein 1 Like 2
ALT- Alaninaminotransferáza
AST- Aspartátaminotransferáza
ATP- Adenosin trifosfát
B1c- B-buněčný lymfom
CCL- C-C motiv chemokine ligand 5
CD3G- Protein kódující genem
CO₂- Oxid uhličitý
COX-2- Cyklooxygenáza-2
CVD- kardiovaskulární onemocnění
deMet- Demetylovaný
DMEM- Dulbecco's Modified Eagle Medium
EGCC- Epikatechin galát
ER α +- α -estrogenový receptor
FBS- Fetální hovězí sérum
FDA- Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
GIT- Gastrointestinální trakt
GlcA- Glukoronová kyselina
GT- Glutamyltransferáza
H₂O₂ - Peroxid vodíku
HBBS- Hanksův vyvážený solný roztok
HIP1- Protein interagující s huntingtinem 1
HPA- Hypotalamická-hypofyzární-nadledvinová osa
HUVEC- Endoteliální buňky lidské pupeční žíly
IGF-I- Růstový faktor
INF- Interferon gama
KVO- kardiovaskulární onemocnění
IL- Interleukin
LC- Kapalinová chromatografie
LDL- Lipoprotein s nízkou hustotou (Low density lipoproteins
LTF- Lactotransferrin
LOD- Limit detekce
LOQ- Limit kvantifikace
m/z- Hmotnost/náboj iontu
MAPK- Mitogenem aktivované proteinkinázy
MEM-F12- Dulbeccovo modifikované Eaglesovo médium
MRP- Membránový transportér (MRP2,MRP3 a MRP4)
MS- Hmotnostní spektrometr
ND- Neurodegenerativní onemocnění
NLC- Nanostrukturovaný lipidový nosič
NO- Oxid dusnatý

Nrf2- Jaderný faktor erythroid 2
O₂- kyslík
OH- Hydroxyl
OXY- Oxyresveratrol
p-53- Buněčný nádorový antigen p53
PI3K-Act- Intracelulární signální dráha (regulace buněčného cyklu)
PIC- Piceatannol
Q- Kvadrupól Time-of-Flight
R²- koeficient determinace
ROS- Kyslíkové radikály
RSV- Resveratrol
RT- Retenční čas
Sirt- Sirtuin
SO₃H- Sulfát
SULT- Sulfotransferázy
TEER- Transepiteliální elektrický odpor
Thr- Threonin
THU- Thunaben
TNF- α - Faktor nádorové nekrózy α
TOF- Time-of-Flight
Tyr- Tyrosin
UGT- Glukuronosyltransferáza
UPLC- Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UV- Ultrafialové záření
VCEAC- Antioxidační kapacita ekvivalentní vitamínu C
VLDL- Lipoprotein o velmi nízké hustotě