

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality a bezpečnosti potravin



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

**Metabolismus kyseliny ferulové v *in vitro* modelu tlustého
střeva**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Hana Bařtipánová

Obor studia: Výživa a potraviny

Vedoucí práce: Ing. Veronika Jarošová, Ph.D.

Čestné prohlášení

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

V Praze dne 25.4.2021

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala mé vedoucí práce Ing. Veronice Jarošové, Ph.D. a mé konzultantce Ing. Kateřině Tomisové za cenné rady a pomoc při zpracování této diplomové práce, ochotu, trpělivost, vstřícný přístup a všechnen čas, který mi věnovaly. Velké poděkování také patří mé rodině za podporu a povzbuzování po celou dobu mého studia.

Metabolismus kyseliny ferulové v *in vitro* modelu tlustého střeva

Souhrn

Kyselina ferulová je hojná nízkomolekulární fenolová kyselina, odvozená od kyseliny hydroxyškořicové. Jedná se o kyselinu s nízkou toxicitou, která se snadno absorbuje a metabolizuje v lidském těle. Vyskytuje se v buněčných stěnách rostlin, zejména v celozrnných obilovinách. Má mnoho pozitivních vlastností působících na organismus a širokou škálu biologicky aktivních vlastností, ale je známá zejména díky antioxidační aktivitě. Vzhledem k jejím vlastnostem a nízké toxicitě je široce využívána v potravinářském a kosmetickém průmyslu.

Praktická část diplomové práce byla zaměřena na katabolismus kyseliny ferulové působením mikrobioty tlustého střeva obsažené ve vzorcích stolice. Kyselina ferulová byla fermentována v *in vitro* fekálním fermentačním systému s využitím vzorků čerstvé stolice od 20 různých dárců jako inokulum. Byly sledovány změny ve spektrech a vznik metabolitů v časech fermentace 0, 2, 4, 8 a 24 hodin. Vzorky byly podrobeny NMR analýze, spektra analyzována v programu MestReNova a Chenomx 8.5 a následně byly výsledky statisticky vyhodnoceny. Cílem praktické části bylo stanovit hlavní katabolity kyseliny ferulové v modelu tlustého střeva.

Kyselina ferulová byla během naší studie metabolicky transformována mikrobiotou tlustého střeva. Ukázaly se významné rozdíly v mikrobiální transformaci kyseliny ferulové a jejích metabolitů. Vznikly metabolity byly kyselina hydroferulová, 3-fenylpropionová, 3-(3-hydroxyfenyl)propionová, 3,4-dihydroxyhydroškořicová, 3,4-dihydroxyfenyloctová a kyselina 3-hydroxyfenyloctová. Byly zjištěny silné interindividuální rozdíly v rychlosti přeměny a intenzitě metabolismu mezi vzorky stolice získaných od jednotlivých dárců.

Klíčová slova: Fenolové sloučeniny, kyselina ferulová, metabolismus, mikrobiota, trávicí trakt

Metabolism of ferulic acid in an *in vitro* colon model

Summary

Ferulic acid is an abundant low molecular weight phenolic acid derived from hydroxycinnamic acid. It is an acid with low toxicity that is easily absorbed and metabolized in the human body. It occurs in the cell walls of plants, especially in the whole grain cereals. It has many positive attributes acting on the organism and a wide range of biologically active attributes, but it is known mainly for its antioxidant activity. Due to its properties and low toxicity, it is widely used in the food and cosmetic industries.

The practical part of this thesis was focused on the catabolism of ferulic acid caused by the colon microbiota contained in stool samples. Ferulic acid was fermented in an *in vitro* fecal fermentation system using fresh stool samples from 20 different donors as inoculum. Changes in spectra and the formation of metabolites at fermentation times of 0, 2, 4, 8 and 24 hours were monitored. The samples were subjected to NMR analysis, the spectra were analyzed in the MestReNova and Chenomx 8.5 programs, and then the results were statistically evaluated. The aim of the practical part was to determine the main catabolites of ferulic acid in the colon model.

Ferulic acid was metabolically transformed by a colon microbiota during our study. Significant differences in the microbial transformation of ferulic acid and its metabolites were shown. The resulting metabolites were hydroferulic acid, 3-phenylpropionic acid, 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid, 3,4-dihydroxyhydrocinnamic acid, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and 3-hydroxyphenylacetic acid. Strong interindividual differences in conversion rate and metabolic rate were found between stool samples obtained from individual donors.

Keywords: Phenolic compounds, ferulic acid, metabolism, microbiota, digestive system

Obsah

| | |
|--|-----------|
| 1 Úvod | 8 |
| 2 Vědecká hypotéza a cíle práce | 9 |
| 3 Literární rešerše | 10 |
| 3.1 Fenolové sloučeniny | 10 |
| 3.1.1 Fenolové kyseliny | 11 |
| 3.1.1.1 Kyselina ferulová | 12 |
| 3.2 Trávicí trakt člověka | 14 |
| 3.3 Mikrobiota trávicího traktu | 19 |
| 3.3.1 Vývoj mikrobioty | 20 |
| 3.3.2 Střevní mikrobiota | 21 |
| 3.3.3 Mikrobiota a polyfenoly | 23 |
| 3.3.3.1 Transformace polyfenolů | 23 |
| 3.4 Metabolismus kyseliny ferulové | 24 |
| 3.5 <i>In vitro</i> modely trávicí soustavy | 27 |
| 4 Metodika | 31 |
| 4.1 Chemikálie | 31 |
| 4.2 Fermentace | 31 |
| 4.2.1 Fermentační médium | 31 |
| 4.2.2 Redukční roztok | 31 |
| 4.2.3 Sodno-fosfátový pufr | 31 |
| 4.2.4 Odběr a příprava vzorků stolice | 31 |
| 4.2.5 Příprava 96-jamkových deep-well destiček | 32 |
| 4.2.6 Příprava roztoku kyseliny ferulové | 32 |
| 4.2.7 Proces fermentace | 32 |
| 4.2.8 Příprava vzorků pro NMR analýzu | 32 |
| 4.2.9 NMR analýza | 32 |
| 4.2.10 Statistická analýza | 33 |
| 5 Výsledky | 34 |
| 6 Diskuze | 41 |

| | |
|---|-----------|
| 7 Závěr..... | 44 |
| 8 Literatura..... | 45 |
| 9 Seznam obrázků a tabulek | 53 |

1 Úvod

Fenolové sloučeniny jsou přijímány jako součást rostlinné složky stravy. V procesu trávení a vstřebávání většinou prostupují v nezměněné formě do tlustého střeva, kde jsou rozkládány na metabolity, z velké části na fenolové kyseliny. Ty vykazují řadu příznivých účinků a mohou být zodpovědné za některé pozitivní efekty polyfenolů na lidské zdraví. Předpokládá se, že přispívají k prevenci různých degenerativních onemocnění, včetně kardiovaskulárních onemocnění. Tento předpoklad pochází z *in vitro* studií, které ukazují antioxidační vlastnosti některých polyfenolů a jejich schopnost modulovat aktivitu různých enzymů. Důkazy, že polyfenoly přispívají k ochraně proti různým onemocněním, vyplývají z řady epidemiologických a klinických studií nebo pokusů na zvířecích modelech.

Bylo zjištěno, že dávky určitých polyfenolových sloučenin mohou způsobit změnu ve složení střevní mikrobioty tím, že určité bakteriální populace jsou inhibovány a jiné mohou být zvýhodňovány. Působení na bakteriální růst a metabolismus je ovlivněno strukturou polyfenolu, koncentrací látky a druhem mikroorganismu.

Jedním z nejbohatších a nejprostudovanějších mikrobiálních společenstev lidského těla je mikrobiota stolice. Mikrobiální společenstva stolice svým složením nejlépe odráží složení mikrobioty v tlustém střevě. Studium stolice tak poskytuje dobrou představu o tom, co se děje ve střevech. Střevní mikrobiom má dohromady 20× více genů než kolik má člověk. V dospělém věku je mikrobiom vysoce stabilní. Zdravý dospělý střevní mikrobiom je obecně považován za stabilní až do vyššího věku, který se vyznačuje přirozenou změnou, poklesem stability a funkce mikrobiomu. Složení střevních mikroorganismů se během stárnutí mění nekonstantním způsobem. V průběhu stárnutí organismu dochází zároveň s fyziologickými změnami (pomalejší obnovou sliznice trávicího traktu, větší nemocností a větším množstvím užívaných léků) též ke změnám ve stravování, hlavně co se týká kvality a složení přijímané potravy. To může vést ke změně skladby mikrobioty. Proto pro udržení dobrého zdraví ve vyšším věku je důležité dodržovat zásady zdravého a kvalitního stravování. Složení a funkce střevní mikrobioty úzce koreluje se zdravotním stavem. Zdravotní stav hostitele a kondice jeho mikrobiální komunity jsou navzájem propojené. Zdraví senioři disponují mikrobiotou podobnou střevním mikroorganismům zdravých dospělých jedinců stejné populace. Století lidé jsou nositeli střevní mikrobioty odlišné od mikrobiální komunity nižšího věku. Snížená diverzita střevních mikroorganismů koreluje s biologickým, nikoliv chronologickým věkem. Změny mikrobioty dále odráží geografické rozdíly, individuální podmínky a dietní zvyklosti v různých zemích napříč kontinenty a etniky.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem teoretické části diplomové práce je zpracování literární rešerše zaměřené na kyselinu ferulovou a osud fenolových sloučenin v trávicím traktu člověka. Cílem praktické části je stanovit hlavní katabolity kyseliny ferulové v modelu tlustého střeva s využitím stolice dárců ze dvou věkových skupin (do 45 let a 70 let a více).

Hypotézy:

- 1) Kyselina ferulová bude mikrobiálně transformována mikrobiotou tlustého střeva.
- 2) Katabolity kyseliny ferulové se budou mezi dvěma sledovanými věkovými skupinami lišit.

3 Literární rešerše

3.1 Fenolové sloučeniny

Fenolové, fenolické či polyfenolické rostlinné látky náleží do různorodé skupiny sekundárních metabolitů rostlin a jsou významnou složkou lidské stravy (Fresco et al. 2006; Balasundram et al. 2006). Představují jednu z nejpočetnějších a nejrozšířenějších skupin přírodních produktů rostlinné říše (je známo více než 8000 fenolových struktur) (Tsao 2010). Z chemického hlediska jsou to látky obsahující aromatické jádro nesoucí jednu nebo více hydroxylových skupin, včetně jejich funkčních derivátů (Shahidi & Naczk 2004). Může se jednat o jednoduché látky s nízkou molekulovou hmotností i o komplexní sloučeniny, polymery s vysokou molekulovou hmotností (Balasundram et al. 2006).

Rostlinné polyfenoly lze dělit do několika skupin, a to na jednoduché fenoly, fenolové kyseliny a jejich deriváty, flavonoidy, isoflavonoidy, stilbeny, taniny, ligniny, lignany, kumariny a další. Nejběžněji zastoupenými rostlinnými polyfenoly jsou flavonoidy, fenolové kyseliny a lignany (Velíšek & Hajšlová 2009).

Tyto látky jsou obsaženy v cereáliích, luštěninách, ořechách, nápojích (čaj, víno, káva, ovocné džusy) a v zelenině a ovoci, např. v plodech borůvek, ostružin, angreštu, rybízu, jablek a rozinek a dalších (Shahidi & Naczk 2004; Tsao 2010). Pro některé druhy potravin byly stanoveny průměrné hodnoty celkového množství polyfenolů. Tyto hodnoty však nemohou být brány jako směrodatné. Obsah polyfenolů se totiž mezi odrůdami jednoho ovoce, například jablek, může značně rozcházet (Hammerstone et al. 2000).

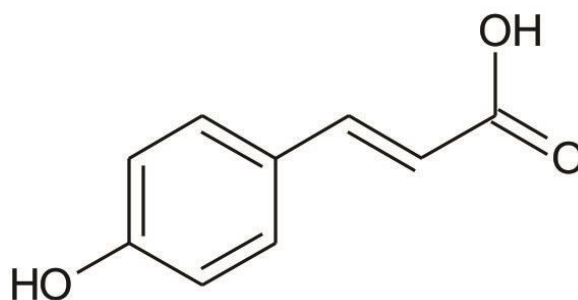
Fenolové sloučeniny jsou nezbytné pro růst, vývoj a rozmnožování rostlin. Fungují jako antibiotika, přírodní pesticidy, atraktanty pro opylovače, ochranné látky proti ultrafialovému záření, strukturální materiály pro zvýšení stability rostlin a izolační materiály, díky nimž jsou buněčné stěny nepropustné pro plyny a vodu (Shahidi & Naczk 2004).

Rostlinné polyfenoly jsou nejrozšířenějšími sloučeninami v naší stravě, které vstupují do redoxních dějů. Jejich denní příjem byl odhadnut až na 1 g a je tedy výrazně vyšší, než příjem antioxidantů, jako jsou tokoferoly, karoteny nebo askorbová kyselina. Z jedné třetiny je denní příjem tvořen fenolovými kyselinami, zbývající dvě třetiny připadají na flavonoidy a minimální podíl mají ostatní polyfenoly, jako např. lignany nebo stilbeny (Scalbert & Williamson 2000).

V lidském organismu se vyznačují svými protizánětlivými a antioxidantními vlastnostmi. Jejich vlastnosti a aktivita závisí na struktuře, počtu a pozici hydroxylových skupin, na ostatních substituentech aromatického kruhu, a dále na typu jednotlivých fenolových sloučenin (Balasundram et al. 2006). Bylo prokázáno, že rostlinné polyfenoly hrají v lidském zdraví důležitou roli. Vysoký příjem ovoce, zeleniny a obilovin bohatých na polyfenoly souvisí se sníženým rizikem výskytu mnoha závažných onemocnění včetně rakoviny, kardiovaskulárních chorob, chronických zánětů a mnoha dalších degenerativních onemocnění (Tsao 2010).

3.1.1 Fenolové kyseliny

Fenolové kyseliny můžeme rozdělit na 2 podskupiny, a to na deriváty kyseliny hydroxybenzoové a hydroxykskořicové, které jsou odvozeny od kyseliny benzoové a skořicové (Zduńska et al. 2018). Zatímco obsah hydroxybenzoových kyselin v jedlých rostlinách je nízký, kyseliny hydroxykskořicové jsou zde hojnější. Deriváty kyseliny hydroxykskořicové (obrázek č. 1) jsou aromatické sloučeniny s tříuhlíkatým bočním řetězcem a jejich struktura je ve tvaru C₆-C₃. Nejčastěji se vyskytující deriváty kyseliny hydroxykskořicové jsou kyselina ferulová, kávová, sinapová a *p*-kumarová (Shahidi & Wanasundara 1992; Balasundram et al. 2006). Deriváty kyseliny hydroxybenzoové se vyznačují svou typickou strukturou ve formě C₆-C₁. Mezi tyto kyseliny se řadí kyselina gallová, *p*-hydroxybenzoová, protokatechová, vanilová a syringová (Balasundram et al. 2006).



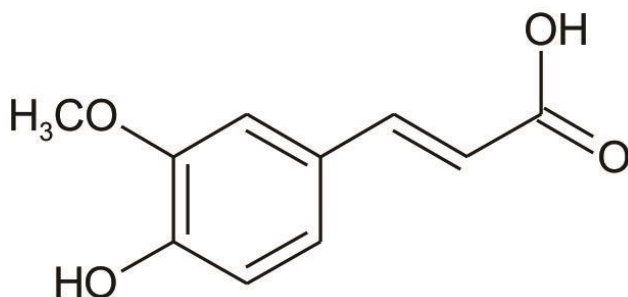
Obrázek č. 1: Vzorec kyseliny hydroxykskořicové

Fenolové kyseliny jsou látky hojně zastoupeny v naší stravě. Patří mezi nejvíce zastoupené fenolové látky pšenice a jsou tak jednou z hlavních komplexních skupin fotochemikálií v obilném zrna (Balasundram et al. 2006). Obsah fenolových kyselin různých druhů ovoce se kvalitativně liší a kvantitativně značně mění v průběhu růstu a zrání plodů. V jablkách v době sklizně je např. cca 12 mg/kg čerstvé hmotnosti kyseliny *p*-kumarové, 85 mg/kg kávové a 4 mg/kg ferulové. V době zralosti je obsah těchto kyselin 1,9; 10,4 a 0,4 mg/kg (Velíšek 2002).

Těmto kyselinám se v potravinářském průmyslu začala věnovat pozornost díky jejich potenciálně zdravotně prospěšným vlastnostem (Kaur et al. 2018). Vykazují antioxidační vlastnosti a slouží jako zhášecí volných radikálů, které na lidský organismus mají silně nepříznivý vliv a způsobují celou škálu nemocí, mezi které patří onemocnění srdce, rakovina nebo mrtvice (Robbins 2003). Fenolové kyseliny jsou dále známy svou schopností inhibovat oxidaci LDL cholesterolu a blokovat singletový kyslík nebo chelátové prooxidační kovy (De Paula et al. 2017). Mají antivirové, antibakteriální, protizánětlivé, antikarcinogenní a vazodilatační účinky. Jsou citlivé na různé úpravy, zejména pak na tepelné ošetření. Vysoké teploty při pasterizaci nebo sterilaci mohou způsobit oxidaci vedoucí ke značným ztrátám a degradaci těchto sloučenin na nové chemické látky (Nankar et al. 2017; Eroğlu et al. 2018; Kaur et al. 2018; Song et al. 2020).

3.1.1.1 Kyselina ferulová

Kyselina ferulová (obrázek č. 2), strukturním názvem kyselina 4-hydroxy-3-methoxykořicová, je organická sloučenina, patřící do skupiny fenolových kyselin. Byla izolována z rostliny Ločidlo čertovo lejno (*Ferula foetida*) a její jméno byl odvozeno od botanického názvu právě této rostliny (Kumar & Pruthi 2014). Tato kyselina tvoří dva geometrické izomery. *Trans*-izomer je bílá krystalická látka, zatímco *cis*-izomer je žlutavá kapalina. Kyselina ferulová se vyskytuje hlavně jako *trans*-izomer (Schoenrock et al. 1997).



Obrázek č. 2: Vzorec kyseliny ferulové

3.1.1.1.1 Výskyt

Kyselina ferulová je všudypřítomná přírodní fytochemikálie obsažená v semenech a listech rostlin. V buněčné stěně rostlin je vázaná na polysacharidy, glykoproteiny, polyaminy, lignin a hydroxyderiváty mastných kyselin jako jejich postranní řetězec. V malém množství ji najdeme i ve volné formě (Kumar & Pruthi 2014). V potravě je součástí vlákniny, kde je esterovou vazbou vázána na hemicelulózy (Manach et al. 2005). Kyselina ferulová je nejčastější fenolová kyselina celozrnných obilovin, takže ji najdeme v obilných zrnech zejména pšenice, ovsa, ječmene a žita. Nachází se v buněčných stěnách plodin, jako jsou kukuřice, rýže, luštěniny, ořechy (arašídý), pomeranče, jablka, hojná je také v kávě a amarantu, kde hraje klíčovou roli v ochraně a skladování rostlin (Žilić et al. 2011). Dále ji najdeme ve špenátu, rebarboře, petrželi a hroznech (Zduńska et al. 2018). Jako volná se kyselina ferulová vyskytuje v pivu a bramborech (Manach et al. 2005).

Tabulka č. 1: Výskyt kyseliny ferulové (převzato a upraveno z Kumar & Pruthi 2014)

| Zdroj | Množství kyseliny ferulové (mg/0,1 kg) |
|-------------------------|--|
| Bambusové výhonky | 243,6 |
| Sladká kukuřice | 42 |
| Rýže | 24 |
| Celozrnné ovesné vločky | 25–52 |
| Popkorn | 313 |
| Jablko | 0,27–0,85 |
| Káva | 9,1–14,3 |
| Těstoviny | 12 |
| Cukrová řepa | 800 |
| Pomeranč | 9,2–9,9 |

3.1.1.1.2 Vlastnosti

Kyselina ferulová je silný antioxidant a je schopna vyhledávat a zhaset širokou škálu volných radikálů (kyslíkových, dusíkových, hydroxylových) (Kumar & Pruthi 2014). Je silnějším antioxidantem než vitamin E, betakaroten a vitamin C. Kyselina ferulová totiž zůstává v krvi déle než ostatní antioxidanty, lze tedy očekávat, že zůstane v těle dostatečně dlouho, aby pomohla udržet volné radikály. V kombinaci s vitaminem C a E pak vzniká velmi silný rostlinný antioxidant díky synergickému působení všech tří antioxidantů (Srinivasan et al. 2007; Kumar & Pruthi 2014). Kyselina ferulová není jen lapač volných radikálů, ale také inhibitor enzymů, které katalyzují tvorbu volných radikálů (Zduńska et al. 2018).

Vyznačuje se několika biomedicínskými účinky, jako jsou například antialergický, antikarcinogenní, protizánětlivý, antimikrobiální, hepatoprotektivní a vazodilatační efekt. Používá se také jako antitrombotikum (Kumar & Pruthi 2014). Díky široké škále svých terapeutických účinků je užitečná při léčbě onemocnění plic, cukrovky, kardiovaskulárních onemocnění a rakoviny (Paiva et al. 2013). Dále pomáhá snižovat cholesterol a zvyšovat životaschopnost spermií (Ou & Kwok 2004). Kyselina ferulová má nízkou toxicitu, takže se může snadno vstřebávat a metabolizovat v lidském těle (Ou & Kwok 2004). Díky snadné vstřebatelnosti zůstává v krvi déle než jiné fenolové kyseliny (Zduńska et al. 2018).

3.1.1.1.3 Využití

Využití kyseliny ferulové je velice rozsáhlé. Je důležitá při syntéze dalších organických sloučenin, jako je vanilin, kurkumin, kyselina diferulová nebo kyselina sinapová (Kumar & Pruthi 2014). Díky svým vlastnostem a nízké toxicitě má široké využití v potravinářském a kosmetickém průmyslu (Ou & Kwok 2004). V kosmetice se využívá jako fotoprotektivní složka tělových a opalovacích mlék (Kumar & Pruthi 2014). Kyselina ferulová se používá pro přípravu kosmetických přípravků s antioxidačním účinkem. Zpomaluje proces stárnutí tím, že snižuje účinky poškození způsobené volnými radikály na kůži. Díky tomu chrání pokožku před poškozením od slunečního záření a napomáhá k regeneraci poškozené pokožky. Díky

svým vlastnostem pomáhá stabilizovat i ostatní složky přípravku, jako je např. oxidačně labilní vitamin C, a tím činí jednotlivé složky účinnější, odolnější a zvyšuje tak účinnost celého přípravku (Srinivasan et al. 2007; Barberousse et al. 2008). Je vysoce účinná v boji proti vráskám a proti stařeckým skvrnám, protože chrání buňky před tzv. oxidačním stresem. V potravinářství se s ní můžeme setkat v konzervačních činidlech. Díky svým již zmíněným vlastnostem je využívána v lékařství. Můžeme se s ní setkat ve formě doplňků stravy, kdy je použita jako prevence před různým onemocněním (Kumar & Pruthi 2014).

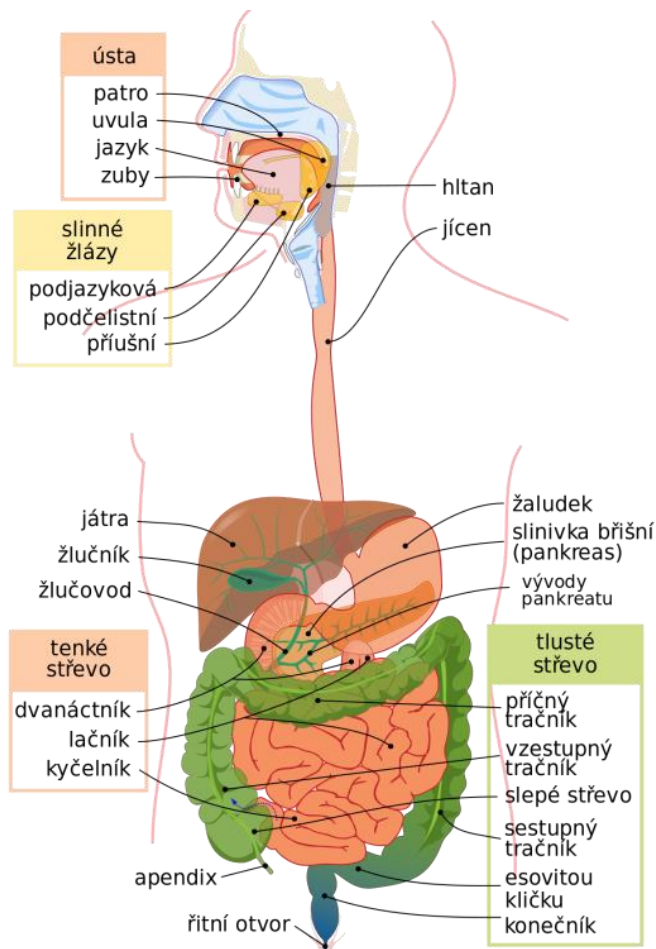
3.2 Trávicí trakt člověka

Pod pojmem přeměna látek a energie neboli metabolismus, rozumíme v souhrnu všechny chemické změny uvnitř těla, zvláště v buňkách. Trávení je naproti tomu pouze přípravný proces, který má povahu zčásti mechanickou a zčásti chemickou (Wunderli 1973). Mechanické rozmělnění potravy zajišťují zuby a jazyk. Smrštěním svalů patra, hltanu a jazyka je sousto odděleno a posunuto do hltanu a polknuto. Jícnem je pak transportováno do žaludku. Mechanické zpracování pokračuje promícháním již polotekuté potravy v žaludku. Pohyby žaludku a střev je trávenina nejen dokonale promíchána s trávicími šťávami, ale je také pomalu posunována trávicím systémem a trávena. Chemickou stránku trávení charakterizuje především produkce šťáv žlázami trávicího traktu. Trávicí šťávy obsahují enzymy, látky bílkovinné povahy s katalytickou aktivitou (Dylevský 2011). Základními funkcemi trávicího traktu je trávení potravy a vstřebávání živin. Kromě toho se trávicí trakt podílí také na zajištění dostatečné ochrany organismu před škodlivými látkami či bakteriemi v potravě (Mourek 2012).

Požítá potrava nemůže být ve svém přirozeném stavu zpracována buňkami našeho těla. Především není možné, aby se v tomto stavu dostala prostřednictvím střeva do krevního řečiště. Podstatou trávení jsou tyto procesy: nejprve jsou požitá potraviny rozloženy na jednotlivé živiny a jejich složky, a to do té míry, že mohou být vstřebány do krve. Poté jsou rozpuštěné živiny a jejich složky prostřednictvím střeva převedeny do krevního řečiště. Tento proces nazýváme vstřebávání (resorpce) (Wunderli 1973). Z hlediska mechanismu jsou dva typy resorpcí: aktivní, která je typická pro tenké střevo, nebo pasivní resorpce, která je omezená na volný prostup rozpuštěných látek přes buňky sliznice vystylající trubici trávicího systému (Dylevský 2011).

Trávicí systém tvoří dva druhy orgánů. Prvním je trávicí trubice procházející od ústní dutiny hrudní, břišní a pánevní dutinou. Tím druhým jsou žlázy připojené k trávicí trubici. Každý oddíl má své drobné žlázy, uložené přímo ve stěně trubice. K trávicí trubici jsou připojeny i velké samostatné žlázy: příušní, podčelistní a podjazyková slinná žláza, slinivka břišní a játra (Dylevský 2011).

Trávicí trubice má tyto úseky (obrázek č. 3): ústní dutina, hltan, jícen, žaludek, tenké střevo (dvanáctník, lačnick a kyčelník), tlusté střevo (slepé střevo, červovitý přívěsek, vzestupný tračník, příčný tračník, sestupný tračník, esovitý tračník a konečník) (Dylevský 2011).



Obrázek č. 3: Trávicí trakt člověka

Gastrointestinální trakt začíná dutinou ústní, kde jsou rozmělněny velké kusy potravy a pomocí slin vylučovaných třemi páry slinných žláz (příušní, podčelistní a podjazyková) jsou lépe polykány. Zároveň sliny rozpouštějí některé z molekul potravy, které mohou reagovat s chemoreceptory v ústech a vedou tak ke vzniku chuti. Sliny obsahují některé elektrolyty, hlen pro lepší průchod potravy, antibakteriální sloučeniny, jako je thiokyanát a peroxid vodíku, sekreční imunoglobulin A, epidermální růstový faktor a trávicí enzymy α -amylázu, lipasu a kalikrein (Gelberg 2014). Dále ústní dutina (*cavum oris*) přechází v hltan (*pharynx*), což je trubice nálevkovitého tvaru, komunikující s otvory v přední stěně s nosní a ústní dutinou (Dylevský 2011). V hltanu se křížují cesty dýchací a cesty polykací. Aby spolknutá sousta nešla špatnou cestou, tj. aby jídlo nevniklo do průdušnice, pokládá se příklopka hrtanová reflexně na průdušnici a uzavírá ji (Wunderli 1973). Po spolknutí se rozmělněné sousto dostává do jícnu, který leží za průdušnicí. Jícen (*oesophagus*) je svalová trubice, která spojuje hltan se žaludkem. Samostatným otvorem v bránici prochází jícen do břišní dutiny, kde se napojuje na první úsek žaludku (Dylevský 2011).

Žaludek (*gaster*) je vakovitý oddíl trávicí trubice, ležící v horní třetině břišní dutiny. Jícen přechází do oddílu žaludku označovaného česlo (*cardia*). Na česlo navazuje vlastní tělo žaludku (*corpus*), které se doleva nahoru vyklenuje v klenbu (*fornix*). Dolů a doprava se žaludek zužuje v trubicovitý vrátník (*pylorus*) (Dylevský 2011).

V žaludku je potrava po určitou dobu skladována, přičemž je současně rozkládána na menší složky (Liao et al. 2009). Zpracování potravy v žaludku probíhá mechanicky a chemicky (působením žaludeční šťávy). V žaludku dochází denně k sekreci přibližně 2 litrů žaludeční šťávy. Ta je z velké části tvořena vodou, dále obsahuje kyselinu chlorovodíkovou, trávicí enzymy (pepsin, lipáza), chymozin a hlen. Ve stěně žaludku se tvoří i glykoprotein, tzv. vnitřní faktor, který ve střevě umožňuje vstřebávání vitamínu B₁₂. Kyselina chlorovodíková má antibakteriální účinek. Pomáhá redukcí železa v potravě z Fe³⁺ na jeho Fe²⁺ formu, která je snadno vstřebatelná a podněcuje sekreci pankreatické šťávy a žluči (Mourek 2012). Sliznice žaludku je pokryta hlenem. Hlen je tvořen glykoproteinem mucinem, který chrání sliznici před jejím natrávením koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou. Smršťováním hladké svaloviny se potrava v žaludku promíchává s hlenem, pepsinem a kyselinou chlorovodíkovou a vzniklá trávenina (chymus) pak řízeně odchází po částech do dvanáctníku (*duodena*) (Ganong 2005).

V žaludku začíná trávení bílkovin, při kterém trávicí enzymy pepsiny štěpí peptidové vazby. Pepsin je vylučován v neaktivní formě jako proenzym pepsinogen a k jeho aktivaci dochází působením nízkého pH v žaludku, které je zajištěno přítomností kyseliny chlorovodíkové (Ganong 2005).

I když se většina živin vstřebává až v tenkém střevě, některé látky (voda, alkohol, elektrolyty, některé léky) se vstřebávají už v žaludku. Žaludek se může značně roztáhnout, a to až třikrát na velikost 4 litry. Potrava v žaludku zůstává přibližně 4 hodiny v závislosti na jejím složení a množství. Potrava s převahou sacharidů je v žaludku nejkratší dobu, delší dobu v něm je potrava bílkovinná a nejdéle v žaludku zůstávají tuky (Marieb et al. 2017).

Dále se trávenina přesouvá do tenkého střeva, které tvoří až 75 % délky celé trávicí trubice. Zde probíhá další chemický rozklad potravy a vstřebávání živin do lymfy a krve (Trojan & Schreiber, 2002). Na chemickém trávení v tenkém střevě se podílí tím, že produkuje střevní šťávu, a dále pankreas a játra, jejichž vývody odvádějí sekrety do dvanáctníku (Seliger et al. 1983). Střevo je také důležité pro imunitní funkce (Liao et al. 2009).

Místo, kde přechází žaludek v tenké střevo, se nazývá vrátník (*pylorus*). Začátek tenkého střeva tvoří dvanáctník (*duodenum*), následovaný lačníkem (*jejunum*) a kyčelníkem (*ileum*). Dvanáctník je podkovitě ohnutý kolem hlavy pankreatu a ústí do něj již zmíněný pankreatický a žlučový vývod. V lačníku je sliznice uspořádána v kruhovitých řasách, které napomáhají promíchávání střevního obsahu. V této části dochází hlavně k trávení. V kyčelníku už se zmíněné řasy redukují a zde se vstřebávají živiny (Seliger et al. 1983). Celá sliznice tenkého střeva je pokryta tenkými výběžky sliznice zvanými klky, jimiž se podstatně zvětšuje povrch sliznice. Klky se postupně zmenšují od proximálního k distálnímu konci tenkého střeva a mají různé tvary v různých segmentech tenkého střeva (Bass & Wershil 2016). V klcích jsou bohatě rozvětveny krevní i lymfatické cévy, kterými jsou odváděny živiny. Sliznicí, tvořenou jednovrstevným epitelem se střevní obsah vstřebává. Mezi klky jsou drobné střevní žlázy, které produkují střevní šťávu (Seliger et al. 1983).

V tenkém střevě se trávenina promíchává s trávicími šťávami a žlučí a je dále zpracovávána. Podílí se na tom jak enzymy pankreatické šťávy (neutralizuje kyselost tráveniny ze žaludku a obsahuje enzymy, které štěpí tuky, cukry, peptidy a nukleové kyseliny), tak enzymy, které jsou produkovány samotným tenkým střevem. Střevní sekrece je

vyvolávána mechanickými vlivy tráveniny na střevní sliznici nebo vlivem hormonů trávicího traktu (sekretin, cholecystokinin). Vlastní sekret se skládá z enzymů, vody, hlenu a elektrolytů. Z enzymů se zde vyskytují proteolytické enzymy (peptidázy), enzymy štěpící cukry (sacharáza, maltáza, laktáza atd.), a také střevní lipáza, popř. fosfolipáza (Mourek, 2012).

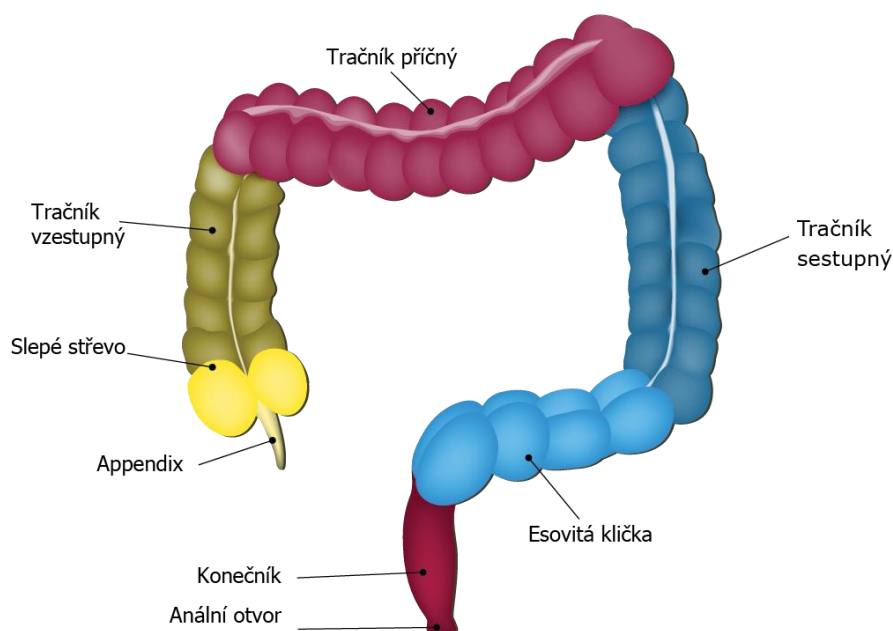
V tenkém střevě probíhá trávení a vstřebávání sacharidů. Hlavním polysacharidem je rostlinný škrob, který se skládá z amylózy a amylopektinu. Glykogen je polysacharid živočišného původu, který je tvořen molekulami glukózy s rozvětvenými řetězci připojenými $\alpha(1\rightarrow6)$ glykosidovými vazbami. Mezi další sacharidy patří disacharid sacharóza a laktóza. Enzym α -amyláza způsobuje hydrolyzu vazby $\alpha(1\rightarrow4)$, čímž vznikají oligosacharidy, přesněji disacharid maltóza, trisacharid maltotrióza a α -dextriny. Z kartáčového lemu enterocytů tenkého střeva se vylučují oligosacharidázy, jako jsou např. laktáza, sacharidáza, maltáza a izomaltáza, které štěpí zmíněné oligosacharidy. Laktáza štěpí laktózu na glukózu a galaktózu. Izomaltáza, maltáza a sacharáza štěpí maltózu a maltotriózu na molekuly glukózy. Sacharáza hydrolyzuje sacharózu na molekulu glukózy a fruktózy. Tyto vzniklé jednoduché cukry jsou následně vstřebány do krve (Granger et al. 2018).

Pokračuje zde trávení polypeptidů, které vznikly štěpením v žaludku. Ke štěpení dochází pomocí působení proteolytických enzymů pankreatické a střevní šťávy. Endopeptidázy, mezi které patří trypsin, chymotrypsin a elastáza štěpí vnitřní peptidové vazby. Trypsin je vylučován z pankratu jako neúčinný trypsinogen, tedy nepůsobí na samotnou žlázu. Činnost trypsinu je aktivována enteropeptidázou, která mění neúčinný trypsinogen na trypsin. Další štěpení obstarávají exopeptidázy, tedy aminopeptidázy a karboxypeptidázy, které odštěpují jednotlivé aminokyseliny z konce řetězců. Aminokyseliny uvolněné z peptidů vstupují do vrátnicové žíly. Bílkoviny, které nebyly stráveny nebo zpracovány v tenkém střevě, jsou rozloženy v tlustém střevě činností bakterií (Silberagl & Despopoulos 2004).

Pankreatická lipáza štěpí tuky, přesněji triacylglyceroly, na glycerol a mastné kyseliny. Tuky však musí být nejprve emulgovány neboli rozptýleny v drobné kapénky. Emulgování nastává působením žluči, kdy soli žlučových kyselin působí snížení povrchového napětí a tuk se rozptýlí na drobné kapénky. Tím se značně zvětší povrch a lipáza se dostává rychleji k částčkám tuku. Po emulgaci dochází k enzymatické hydrolyze lipidových esterů. Následně nastane přeměna ve vodě nerozpustných lipolytických produktů na ve vodě rozpustnou formu, která může být snadněji absorbována. Vzniklé mastné kyseliny a glycerol se hromadí do struktur zvaných micely. Monoglyceridy a mastné kyseliny, které mají 10–12 atomů uhlíku, difundují přes membránu a prostupují ze slizničních buněk rovnou do vrátnicové žíly. Mastné kyseliny s více než 10–12 atomy uhlíku jsou ve slizničních buňkách znovu esterifikovány na triacylglyceroly. Z triacylglycerolů a cholesterolu vznikají větší částice zvané chylomikrony, které pronikají do krevního oběhu lymfatickými cévami (Casparý 1992).

Dále zde enzym nukleáza štěpí RNA a DNA na jednotlivé nukleotidy. Ty se dále rozkládají působením nukleotidázy na nukleosidy. Enzym nukleosidáza štěpí nukleosidy na výsledné produkty, a to na kyselinu fosforečnou, dusíkatou bázi a cukr (Cole & Kramer 2015).

Na tenké střevo navazuje přes ileocekální chlopeň střevo tlusté. Chlopeň se otevírá pouze tehdy, když je obsah tenkého střeva dostatečně natráven (Dylevský 2011). Tlusté střevo (obrázek č. 4) je poslední částí trávicího traktu. Měří přibližně 150 cm a na rozdíl od střeva tenkého jeho sliznice neobsahuje klky. Stěna tlustého střeva je poměrně tenká, protože je redukována především její svalová vrstva – podélná i cirkulární. Redukce podélné vrstvy se projevuje výdutěmi stěny, neboli haustry. Ve sliznici je velké množství hlenových žlázek, které produkují hlen chránící vnitřní povrch střeva při tvorbě a posunu odpadních látek. Tlusté střevo začíná slepým střevem (*caecum*), ze kterého vystupuje červovitý výběžek (*appendix vermiformis*). Dále následuje vzestupný tračník (*colon ascendens*), příčný tračník (*colon transversum*), sestupný tračník (*colon descendens*) a esovitý tračník (*colon sigmoideum*). Následuje konečník (*rectum*) a řitní otvor (Bass & Wershil 2016).



Obrázek č. 4: Tlusté střevo

V tlustém střevě se shromažďují nestrávené zbytky potravy a obsah střeva se zde zahušťuje. Pohyby tlustého střeva jsou podobné peristaltickým pohybům střeva tenkého. Z obsahu tlustého střeva se vstřebává hlavně voda, některé minerální látky a cukry. Nejvíce vody se vstřebává ve vzestupném tračníku. K zahuštěnému obsahu se přidává hlen, který slepuje nestrávené zbytky potravy (Dylevský 2011).

Tlusté střevo má nejhustší a nejrozmanitější mikrobiom z celého gastrointestinálního traktu. Uvnitř tlustého střeva se zvyšuje bakteriální diverzita od slepého střeva, vzestupného a příčného tračníku k sestupnému tračníku a konečníku (James et al. 2020). Zbytky potravy se účinkem kvasných a hnilobných bakterií, které žijí ve střevní sliznici, zkvašují a bílkoviny podléhají hnití. Bakterie kvasí tuky, cukry a těžce stravitelnou celulózu. Vzniká tak alkohol a plyny, jako jsou metan, vodík a oxid uhličitý. Hnitím bílkovin se vytváří jedovaté látky, například sirovodík, fenol a mastné kyseliny. Před účinkem hnilobných a kvasných produktů

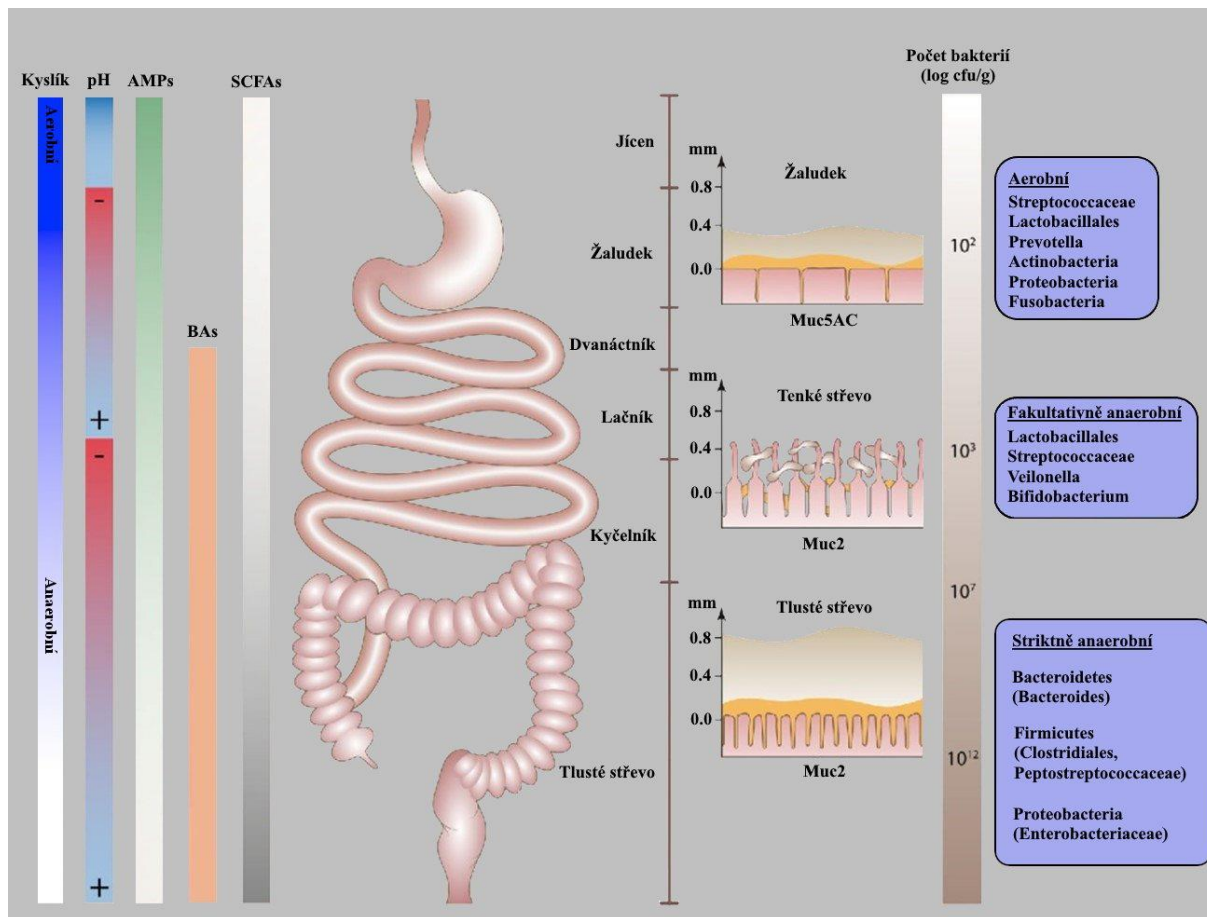
chrání sliznici tlustého střeva hlen, který zabraňuje i jejich resorpci do krevního oběhu (Dylevský 2011).

Stěna gastrointestinálního traktu je složena ze 4 vrstev, a to sice z mukózy (sliznice), submukózy, vnější a vnitřní svalové vrstvy a serózy (v dutině břišní) popřípadě adventicie (v dutině hrudní a pánevní) (Bass & Wershil 2016). Svalová vrstva se skládá z vnější podélné a vnitřní kruhové svaloviny. Na kolagen bohatá submukóza a mukóza se nachází uvnitř svalové vrstvy. Další tenká vrstva svalů – *lamina muscularis mucosae*, se vyskytuje téměř po celé délce traktu jako vnější část sliznice. Kontrakce se v každé části traktu značně liší. Pohyby stěn během digesce a absorpce jsou výsledkem kontrakcí dvou vrstev hladkého svalstva. Stažení podélné svaloviny zkrátí střevní stěny, zatímco peristaltické stahy kruhové svaloviny obsah pomalu posouvají a promíchávají (Liao et al 2009). Epitel gastrointestinálního traktu je chráněn sekrecí hlenu. Funkcí hlenu je usnadňovat klouzání střevního obsahu, chránit sliznici před mechanickým poškozením i před poměrně silnými kyselinami včetně vlastní HCl. Hlavní je však vytvářet ochrannou bariéru proti vlastním agresivním enzymům. Tvorba a vylučování hlenu může trvat několik minut až hodin, v závislosti na orgánu a na situaci. Např. invaze patogeny vyžaduje rychlou reakci epitelu. Stejně tak se liší tloušťka hlenovité vrstvy (Derrien et al. 2010). Hlenovou vrstvu můžeme rozdělit na dvě různé vrstvy. Vnější vrstva je z velké části rozpustná, neadherentní, a je neustále odstraňována spolu s potencionálně nebezpečnými činiteli (např. mikroorganismy nebo viry). Vnitřní vrstva není rozpustná ve vodě, je adherentní, pevně přiléhá k epitelu, působí jako selektivní bariéra a umožňuje průchod pouze pro menší molekuly. Spodní vrstva neobsahuje téměř žádné bakterie, naopak vrchní vrstva je na mikrobiotu velmi bohatá (Hansson & Johansson 2010).

3.3 Mikrobiota trávicího traktu

Společenství mikrobů je souhrnně označováno jako mikrobiota. Mikrobiota je kritická pro mnoho aspektů zdraví a dysbióza, tedy nerovnováha komenzálů a patogenů je spojena s mnoha chorobnými stavy. Složení mikrobioty na jakémkoli místě ve střevech je určeno dostupností živin a kyslíku a rychlostí přenosu lumenálního obsahu. Imunitní systém střev má symbiotický vztah s mikrobiomem a je zásadní pro udržení integrity epitelové bariéry (James et al. 2020).

Lidská mikrobiota se skládá z mnoha druhů mikroorganismů, mezi ně patří bakterie, kvasinky, viry, plísňe a archaea. V celé délce gastrointestinálního traktu dochází k postupným změnám ve skladbě mikroorganismů (obrázek č. 5) (Hollister et al. 2014). Celkový počet se odhaduje na 10^{13} – 10^{14} mikroorganismů (Hansson & Johansson 2010). Počet a složení bakterií se v jednotlivých částech trávicího traktu významně liší. Množství bakterií v traktu roste distálním směrem. V žaludku je jich nejméně, přibližně 10^2 . Od začátku tenkého střeva se počet pohybuje kolem 10^3 , v distální části kyčelníku je jich 10^7 – 10^8 a nejvíce se jich vyskytuje v tlustém střevě, kolem 10^{11} – 10^{12} mikroorganismů (Patterson et al. 2016; Minalyan et al. 2017). Důvodem menšího množství mikroorganismů v horních částech trávicího traktu je přítomnost kyselin, žluči nebo sekretů pankreatu, které zabíjejí přítomné mikroorganismy (Kumar Singh et al. 2019).



Obrázek č. 5: Zastoupení mikroorganismů v jednotlivých částech zažívacího traktu (upraveno a převzato z Gorkiewicz & Moschen 2018)

Charakterizovat lidskou mikrobiotu lze pomocí několika parametrů, jako jsou např. bohatost, diverzita a rovnováha mikroorganismů. Tyto parametry mohou napovídat, zda se jedná o složení zdravého lidského mikrobiomu. Vyšší diverzita a bohatost bakteriálních druhů ve střevě může být indikátorem zdravého mikrobiomu (Hollister et al. 2014). Proto u jedinců s více rozmanitým mikrobiomem lze pozorovat vyšší stabilitu než u jedinců s nižší diverzitou (Flores et al. 2014).

Každý jedinec má svou kombinaci převládajících druhů, protože každý má jedinečné složení mikrobioty. Podle toho, jaké bakterie převládají, se lidský mikrobiom dělí do 3 enterotypů. Pro enterotyp 1 je typická převaha zástupců *Bacteroides*. Enterotyp 2 je obohacen zejména zástupci *Prevotella* a enterotyp 3 je spojen se zástupci rodu *Ruminococcus*. Enterotyp 1 získává energii ze sacharidů pomocí glykolýzy. Enterotypy 2 a 3 jsou spojovány s degradací mucinu (Arumugan et al. 2011).

3.3.1 Vývoj mikrobioty

Střevní mikrobiota je u kojenců více variabilní ve svém složení a méně stabilní v čase. V prvním roce života probíhá v trávicím traktu hustá kolonizace a výsledkem je směs mikroorganismů velmi podobná směsi mikroorganismů dospělého člověka (Palmer et al. 2007).

Prvotní intenzivní kolonizace střevního prostředí závisí na způsobu porodu. Po vaginálním porodu dochází ke kolonizaci mikroorganismy nacházející se v pochvě, jako je například *Lactobacillus* a *Prevotella*. Zatímco po císařském řezu jsou novorozenci kolonizováni zejména bakteriemi nacházejícími se na matčině kůži, mezi nejčastější patří rody *Staphylococcus*, *Corynebacterium* a *Propionibacterium* (Nibali & Henderson 2016). Způsob porodu ovlivňuje jak složení mikrobioty, tak načasování kolonizace GIT (Palmer et al. 2007).

Dalším faktorem ovlivňující střevní kompozici je způsob kojenecké stravy. Mateřské mléko podporuje množení vyvážené a rozmanité mikrobioty. Příkladem jsou oligosacharidy, které působí na střevní bakterie prebioticky a tím přispívají množení prospěšných bakterií. Při kojení mateřským mlékem převládá v mikrobiomu rod *Bifidobacteria*, *Lactobacillus* a *Bacteroides*, zatímco u nekojených novorozenců jsou zde z větší části enterobakterie a enterokoky. Další složky mateřského mléka (laktoferin, defensiny) inhibují patogeny a přispívají ke složení mikrobioty (Walker & Iyengar 2015).

Vliv na střevní mikrobiotu mají také antibiotika. Jejich podávání způsobuje změnu ve složení jednotlivých druhů bakterií ve střevním mikrobiomu, a díky tomu se mohou vyskytnout různá infekční onemocnění, astma nebo nadváha (Walker & Iyengar 2015).

Jakmile mikrobiom dosáhne zralosti, zůstává většinou stabilní až do stáří. Lze ale najít určité rozdíly mezi staršími lidmi a mladšími dospělými, např. menší variabilita. Starší lidé zaznamenávají významné snížení bakterií rodu *Bifidobacterium* a nárůst rodu *Clostridium*. Tato zjištění mohou souviset s větším počtem nemocí u starších osob a s léky používaných k jejich léčbě (Roca-Saavedra et al. 2018).

3.3.2 Střevní mikrobiota

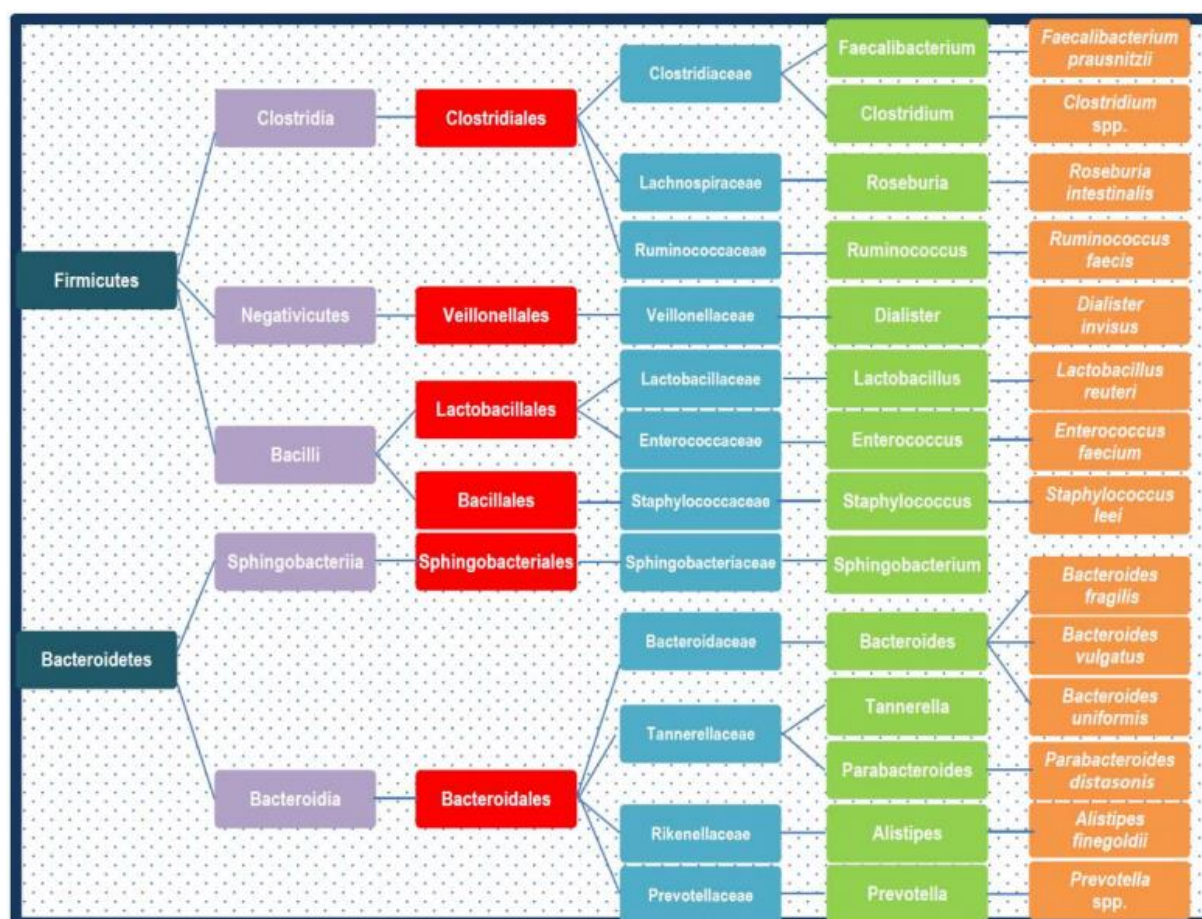
Střevní mikrobiota je velice důležitá z hlediska správného fungování lidského organismu. Mezi funkce střevní mikrobioty můžeme zařadit ochranu střeva před cizími nežádoucími mikroorganismy. Dále má funkci metabolickou, kam patří fermentace nestravitelných zbytků potravy. Důležitou funkcí je vliv na homeostázu a imunitní systém (Guarner & Malagelada 2003). Střevní mikroorganismy nám dále poskytují důležitou fyziologickou funkci, jakou je produkce vitaminů (Hansson & Johansson 2010).

Střevní mikrobiota člověka je velmi různorodá a skládá se z asi 1000 mikrobiálních druhů obývajících GIT, které mají různé zastoupení u každého jedince (Cardona et al. 2013). Složení se může měnit a je ovlivňováno řadou faktorů, mezi které patří zdravotní stav, užívání léků (antibiotika) a stravovací návyky (Nibali & Henderson 2016).

V tenkém střevě, stejně jako v žaludku, se nachází nižší zastoupení mikroorganismů, z důvodu kyselého prostředí a také peristaltiky, která brání stabilní kolonizaci. Počet organismů na začátku tenkého střeva se pohybuje kolem 10^3 KTJ/ml a postupně se zvyšuje až na 10^8 KTJ/ml. Většina mikroorganismů proto raději osidluje tlusté střevo (Kumar Singh et al. 2019). Mikrobiom tenkého střeva je méně složitý než u tlustého střeva a obsahuje více fakultativně anaerobních bakterií (Hayashi et al. 2005). 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).

V tlustém střevě se nachází více než 70 % bakterií kolonizující lidské tělo (přibližně 10^{12} KTJ/ml). Tlusté střevo je hojně osídlené díky příznivým podmínkám, jako je pomalý transport živin tlustým střevem, dostupnost živin a příznivé pH (Payne et al. 2011). Přítomnost bakterií ve střevě je ovšem výhodná i pro hostitele, jelikož někteří zástupci bakterií jsou schopni kódovat proteiny, jejichž funkce je důležitá pro zdraví hostitele. Mohou to být např. enzymy, ale také některé vitaminy (Nibali & Henderson 2016).

Tlusté střevo disponuje bohatou mikrobiotou (obrázek č. 6). Kmeny *Firmicutes* a *Bacteroidetes* tvoří až 90 % střevní mikrobioty. Kmen *Firmicutes* se skládá z mnoha rodů, do nichž patří např. *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus* nebo *Ruminococcus*. Kmen *Bacteroidetes* se skládá z rodu *Bacteroides* a *Prevotella*. Zbýlých 10 % je tvořeno především kmenem *Proteobacteria*, *Actinobacteria* (patří sem rod *Bifidobacterium*), *Fusobacteria* a *Verrucomicrobia*. Kmen *Proteobacteria* je nejvíce zastoupen čeledí *Enterobacteriaceae*, do níž patří nejlépe známá *Escherichia coli* (Rinninella et al. 2019).



Obrázek č. 6: Rozdělení nejčastěji se vyskytujících kmenů střevní mikrobioty, kmenů *Firmicutes* a *Bacteroidetes* (převzato a upraveno z Rinninella et al. 2019)

Stovky gramů bakterií žijící uvnitř lumenu tlustého střeva ovlivňují homeostázu hostitele. Některé z těchto bakterií mohou být potenciaálními patogeny a mohou být zdrojem infekce či sepse za určitých okolností, např. pokud by došlo k funkčnímu nebo fyzickému porušení střevní bariéry (Guarner & Malagelada 2003).

3.3.3 Mikrobiota a polyfenoly

Biologická dostupnost polyfenolů je ve srovnání s mikro- a makroživinami nižší a závisí na složitosti jejich struktury a na stupni polymerace. Kvůli horší absorpci jsou polyfenoly zadržovány v těle delší dobu a díky tomu může být zvýšen jejich příznivý účinek (Kumar Singh et al. 2019). Nízkomolekulární polyfenoly mohou být snadno absorbovány v tenkém střevě, zatímco oligomery a polymery polyfenolů se mohou dostat do tlustého střeva téměř nezměněny. Nevstřebané polyfenoly se mohou hromadit v lumenu tlustého střeva a spolu s konjugáty vylučovanými žlučí jsou vystaveny střevní mikrobiotě. Mikrobiota tlustého střeva je odpovědná za štěpení původních polyfenolových struktur na fenolové metabolity, které mají nízkou molekulovou hmotnost, jsou tudíž lépe vstřebatelné a mohou být zodpovědné za účinky na zdraví spíše než původní sloučeniny nalezené v potravinách. Individuální složení mikrobioty má za následek rozdílnou biologickou dostupnost a bioúčinnost polyfenolů a jejich metabolitů. Polyfenoly ze stravy mohou složení střevního mikrobiomu pozitivně ovlivnit (Cerdá et al. 2005; Gross et al. 2010; Cardona et al. 2013).

Mezi polyfenoly a střevní mikrobiotou existuje vzájemný vztah, který je založený na tom, že mikrobiota metabolicky transformuje polyfenoly a ovlivňuje jejich vstřebávání a naopak polyfenoly a jejich metabolity působí na růst jednotlivých bakteriálních druhů. Tento vliv na růst a složení bakterií v tlustém střevě mají polyfenoly díky své prebiotické funkci. Toto působení je úzce spojené s chemickou strukturou polyfenolů, s jejich koncentrací a záleží na daném typu bakterií. Konzumace potravin s obsahem polyfenolů zvyšuje tvorbu mikrobiálních metabolitů, které jsou nápomocné při udržování střevní homeostázy a celkového zdraví střevního epitelu. Vliv polyfenolů na grampozitivní bakterie je intenzivnější než na gramnegativní, což je pravděpodobně způsobeno odlišnou stavbou buněčných stěn (Cardona et al. 2013; Valdés et al. 2015; Kumar Singh et al. 2019).

3.3.3.1 Transformace polyfenolů

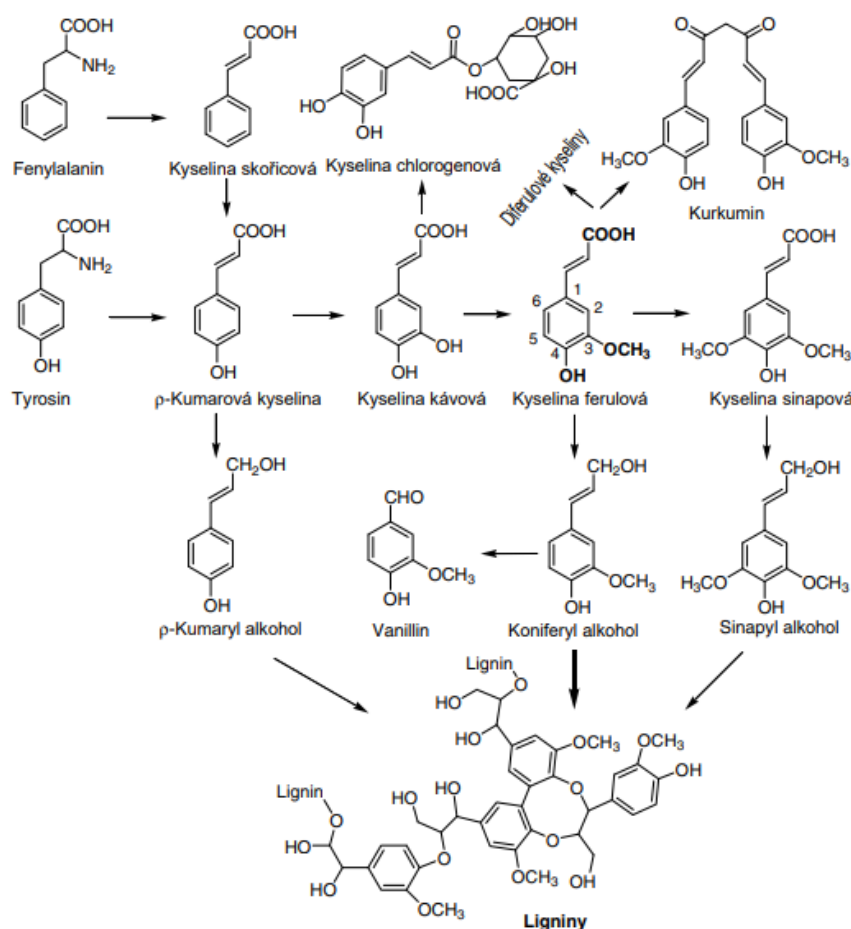
Polyfenoly se v rostlinách a potravinách vyskytují především jako *O*-glykosidy. Většina těchto glykosidů je hydrolyticky přeměněna na biologicky dostupnější aglykony v kyselém prostředí žaludku, mukóze tenkého střeva a pomocí mikroorganismů tlustého střeva (Stevens & Maier, 2016). Bylo odhadnuto, že 5–10 % celkového příjmu polyfenolů je absorbováno v tenkém střevě. Zbývajících 90–95 % přijatých polyfenolů je absorbováno ve střevě tlustém, kde jsou vystaveny enzymatickým aktivitám střevní mikrobioty (Cardona et al. 2013). Po absorpci v tenkém střevě mohou být látky podrobeny biotransformaci Fáze I a Fáze II v enterocytech a poté v hepatocytech, kde vznikají ve vodě rozpustné konjugované metabolity a poté jsou uvolněny do systémového oběhu, distribuovány do orgánů a vyloučeny. Fáze I je metabolická dráha, která zahrnuje oxidaci, redukci a hydrolýzu (Kumar Singh et al. 2019). Fáze II zahrnuje glukoronidaci a sulfataci. Konjugace látek prostřednictvím těchto reakcí zvyšuje jejich polaritu a rozpustnost ve vodě, což napomáhá ke konečnému vyloučení z těla. Látky, které unikly intestinálnímu metabolismu, jsou metabolizovány játry pomocí různých reakcí (oxidace, metylace, hydrolýza) a následně vylučovány žlučí (Gao & Hu 2010).

Látky, které se nevstřebaly v tenkém střevě, pokračují do tlustého střeva, kde jsou, jak už bylo zmíněno výše, transformovány a degradovány střevní mikrobiotou. Mikrobiota přítomná v tlustém střevě vytváří enzymy, jež se podílejí na deglykosylaci, dehydroxylaci

a demetylací. Díky těmto reakcím vznikají nové produkty, které jsou následně z těla vyloučeny močí a stolicí (Pathak et al. 2018).

3.4 Metabolismus kyseliny ferulové

K tvorbě kyseliny ferulové v rostlinách (Obrázek č. 7) dochází ze dvou klíčových aromatických sloučenin, kterými jsou L-fenylalanin a L-tyrosin. Nejprve se fenylalanin a tyrosin přemění na kyselinu skořicovou a *p*-kumarovou pomocí enzymů fenylalaninamoniumlyázy a tyrosinamoniumlyázy. Kyselina *p*-kumarová se pak převede na kyselinu ferulovou hydroxylací a metylací (Graf 1992).

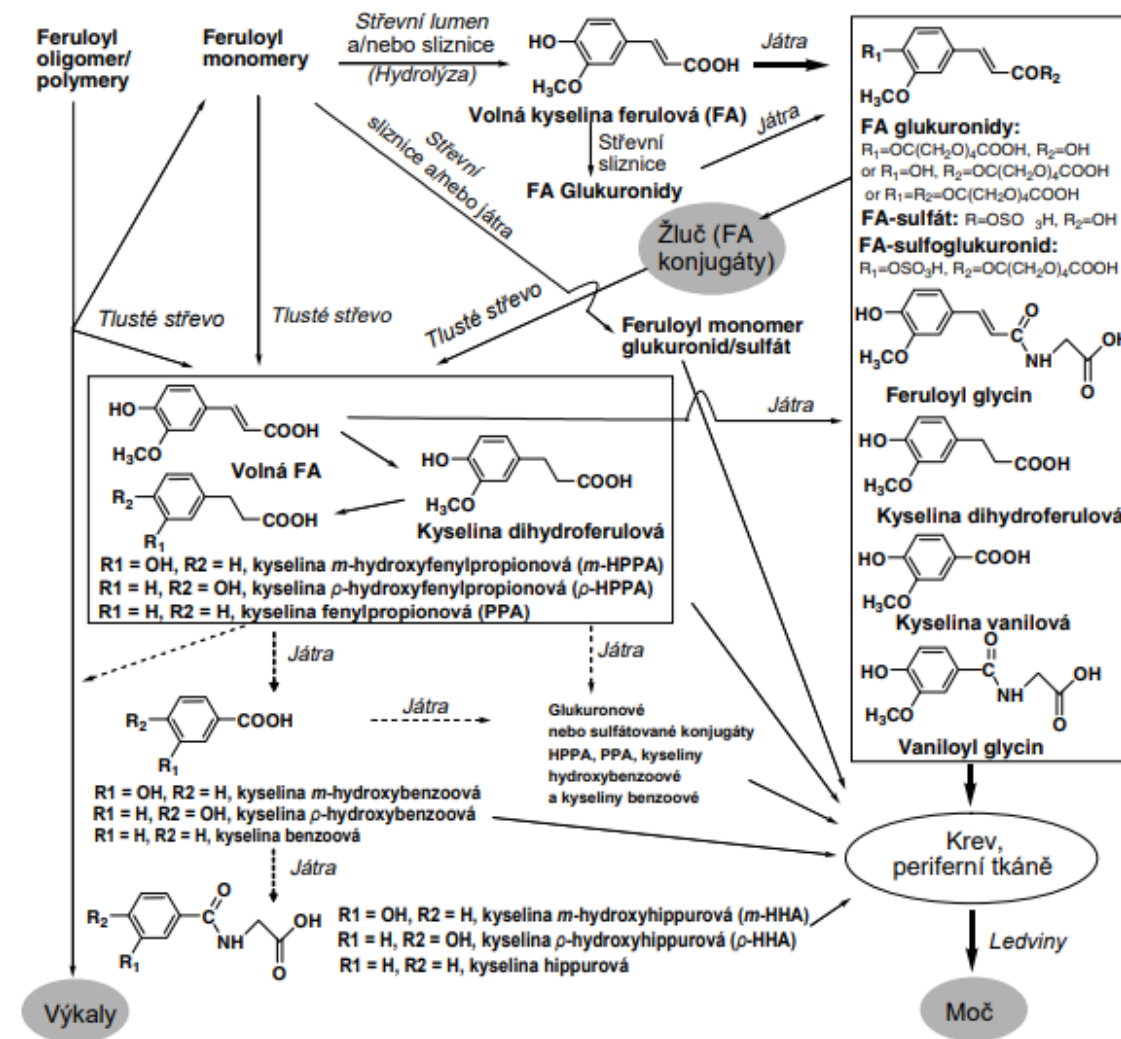


Obrázek č. 7: Syntéza kyseliny ferulové a příbuzných sloučenin v rostlinách (upraveno a převzato z Zhao & Moghadasian 2008)

Jak už bylo zmíněno, převážná část kyseliny ferulové se vyskytuje ve vázané formě na polysacharidy nebo proteiny. Tato vázaná forma nemůže být absorbována stěnou trávicího traktu. Vazby je nutné rozštěpit a volná kyselina ferulová se dostane do lumenu střeva, kde je absorbována a dále metabolizována (Ou & Kwok 2004). Některé feruloyl monomery a oligomery se hydrolyzují v tenkém střevě, zatímco jiné formy se hydrolyzují až ve střevě tlustém působením střevní mikrobioty (Obrázek č. 8) (Zhao & Moghadasian 2008). Nejdůležitějším místem absorpce kyseliny ferulové je tlusté střevo, protože se uvolňuje

z původních sloučenin nebo z potravin mikrobiálními cinnamoyl esterázami. Tyto cinnamoyl esterázy se nacházejí hlavně v lumenu tlustého střeva, pouze malé množství je pak v sliznici tenkého střeva nebo v pankreatických sekrecích (Couteau et al. 2001). Kyselina ferulová je metabolitem kyseliny kávové a po její metylaci katechol-*O*-methyltransferázou je vylučována zpět do lumenu střevními buňkami (Lafay et al. 2006). Jelikož kyselina kávová může být uvolněna aktivitou mikrobiální esterázy z chlorogenové kyseliny, může se díky tomu kyselina ferulová vyskytovat v tlustém střevě po požití jakéhokoli zdroje kyseliny chlorogenové (Poquet et al. 2008).

Kyselina ferulová se v epitelu střeva přeměňuje na řadu metabolitů, mezi které patří sulfát ferulové kyseliny, kyselina hydroferulová, kyselina *m*-hydroxyfenylpropionová, feruloyl glukoronid, sulfoglukuronid ferulové kyseliny (hlavní metabolity v plazmě a moči potkanů), diglukuronid ferulové kyseliny, feruloylglycin, kyselina vanilová a vanilloylglycin. Hlavní metabolickou cestou kyseliny ferulové *in vivo* je konjugace s kyselinou glukuronovou nebo síranem. Konjugace probíhá hlavně v játrech prostřednictvím aktivit sulfotransferáz a glukuronosyltransferáz. Dále probíhá zčásti ve střevní sliznici a ledvinách. Konjugace kyseliny ferulové závisí na její dávce, protože velmi vysoké dávky mohou saturovat konjugační enzymy, což vede k akumulaci volné kyseliny ferulové v plazmě. Malá část kyseliny ferulové může být metabolizována pomocí β -oxidace v játrech. Dále je kyselina ferulová metabolizována střevní mikrobiotou na kyselinu hydroxyfenylpropionovou redukcí, demetylací a dehydroxylací. Metabolity stejně jako nezměněná volná kyselina ferulová cirkulují v oběhovém systému a dostávají se do mnoha orgánů včetně jater, střev, sleziny, ledvin a plic (Zhao & Moghadasian 2008).



Obrázek č. 8: Metabolické dráhy kyseliny ferulové (upraveno a převzato z Zhao & Moghadasian 2008)

Kyselina ferulová je nejčastěji transportována pasivní difuzí. Ta je spíše transecelulární než paracelulární, i přestože kyselina ferulová není omezena těsnými spoji a není závislá na jejich těsnosti. Kromě pasivní transecelulární difuze může být kyselina ferulová dále přenášena usnadněným transportem. Oba tyto mechanismy poskytují volnou kyselinu ferulovou na serózní straně sliznice, pouze s malým množstvím konjugovaných forem. Nejdostupnější formou pro průchod střevní bariérou v těle je volná forma kyseliny, ale také malé procento konjugátů. Volná i konjugovaná forma pak může být dále metabolizována játry (Poquet et al. 2008).

Na dostupnosti, absorpci a následné interakci s cílovými tkáněmi závisí antioxidační aktivita kyseliny ferulové. Je biologicky dostupnější než jiné flavonoidy a v krvi zůstává delší dobu než jiné antioxidanty. Za normálních podmínek vstupuje 56,1 % perfundované kyseliny ferulové do enterocytů a dochází zde ke konjugaci kyseliny ferulové. Výsledné metabolity opouštějí střevní buňky směrem k serózní straně sliznice, protože v lumenu střeva nejsou detekovány žádné konjugované formy. Za těchto podmínek je 56,1 % perfundované kyseliny ferulové, což je množství odpovídající absorpci, vyloučeno mezenterickou žilou do plazmy

jako konjugovaný derivát. Část (přibližně 6 %) vstupuje do hepatocytů a je vyloučeno žlučí. Zbytek je distribuován do periferních tkání a může vykazovat biologické účinky (Srinivasan et al. 2007).

3.5 *In vitro* modely trávicí soustavy

Lidské trávení je složitý proces, při kterém dochází k různým enzymatickým, chemickým a mechanickým procesům. Nejpřesnějším způsobem studia těchto procesů jsou *in vivo* experimenty na lidech a stanovení nejrůznějších biologických dostupností potravin. Tento typ studií má řadu nevýhod, mezi které patří etická omezení, potíže s interpretací dat a vysoké náklady na vybavení a práci. Z tohoto důvodu jsou vyvíjeny systémy trávení *in vitro*, abychom mohli předpovídat chování potravin během trávení a vstřebávání *in vivo*. Modely *in vitro* jsou lépe reprodukovatelné a umožňují lepší kontrolu. Jsou to rychlé a jednoduché metody vyžadující pouze materiály dostupné v laboratoři a proto jsou relativně levné a nákladově efektivní a také nám umožňují zmenšení velikosti vzorku. Na druhou stranu výsledky modelů trávení *in vitro* se často liší od výsledků zjištěných při použití metod *in vivo* vzhledem k obtížnosti napodobení fyzikálně-chemických a fyziologických procesů, které probíhají v lidském nebo zvířecím těle. Klíčovým prvkem je používání realistických trávicích systémů, aby byly výsledky srovnatelné s údaji v *in vivo* (Hur et al. 2011; Alegría et al. 2015; Gim-Krumm et al. 2018).

Mezi nejjednodušší *in vitro* modely pro napodobení trávení patří statické metody. Statické metody, nazývané také biochemické metody, nenapodobují fyzikální procesy jako je např. peristaltika nebo míchání, ale pouze simulují podmínky trávení podobné těm v lidském těle. Statické modely jsou užitečné hlavně v případech, že se jedná pouze o omezenou oblast trávení, např. žaludeční nebo střevní, ale jsou méně použitelné ve studiích celkového trávení. Tyto metody lze využít k vyhodnocení podmínek trávení nebo pozitivního či negativního vlivu potravin. Dále můžeme posuzovat složení potravin a zpracování potravin. Statické modely se využívají především k výzkumu trávení jednoduchých potravin nebo jejich jednotlivých složek (Alegría et al. 2015).

Navzdory potenciálu a široké použitelnosti však statické metody nedokáží napodobit dynamické prostředí trávicího traktu (absorpce, sekrece, peristaltika, vyprazdňování), a fungují hlavně tak, že simulují biochemické procesy GIT. Z tohoto důvodu byly vyvinuty dynamické modely. Přizpůsobení, přežití a šíření *in vivo* získané střevní mikrobioty v těchto *in vitro* modelech jsou závislé na prostředí a různých parametrech (pH, čas, teplota, průtoková rychlost) (Alegría et al. 2015). Dynamické modely fermentace jsou jednostupňové nebo víceúrovňové systémy a využívají se pro dlouhodobé studie. Většina dynamických modelů jsou víceúrovňové a skládají se z více spojovacích nádob. Například při napodobení proximální, příčné a distální oblasti tlustého střeva jsou zapojené 3 chemostaty do série. Atmosféru zde napodobujeme stříkáním dávek N_2 a O_2 . N_2 je výhodnější než CO_2 , protože může ovlivnit pH. První nádoba je charakterizována mírně kyselým prostředím s vysokým obsahem živin způsobující vyšší hustotu mikrobioty podobné proximální části tlustého střeva. Ostatní části se vyznačují neutrálním pH a menším množstvím živin (Payne et al. 2011; Nissen et al. 2020).

TIM (TNO *in vitro* model of the gastrointestinal tract) je model navržený k simulaci dynamických podmínek (složení trávicí tekutiny, hodnoty pH nebo odstraňování vody a metabolitů) v lumenu trávicího traktu během transportu a trávení potravy. Během postupného transportu skrz jednotlivé části trávicího traktu je potrava vystavena různým měnícím se podmínkám v důsledku postupného vylučování zaživacích tekutin a vstřebávání vody a živin (Minekus 2015).

TIM-1 je nejčastěji využívaným typem TIM, který se skládá ze 4 oddílů: žaludek, dvanáctník, lačník a kyčelník. Tyto oddíly jsou tvořeny vnějším skleněným obalem a vnitřní flexibilní silikonovou stěnou. Prostor mezi vnitřní a vnější stěnou je naplněn vodou, kterou se řídí teplota uvnitř a tlak vody simuluje peristaltické pohyby. Všechny čtyři části jsou propojeny uzavíratelnými ventilovými čerpadly, jež řídí průchod tráveniny. Míchání obsahu v jednotlivých oddílech je zajištěno střídáním tlaku a pružnými stěnami a transport tráveniny je regulován ventily. V oddílu žaludku je hodnota pH řízená přidáváním kyseliny chlorovodíkové a ve zbylých částech hydrogenuhličitanem sodným. Produkty trávení jsou odstraňovány dvěma způsoby. Ve vodě rozpustné produkty jsou odstraňovány dialýzou přes membrány. Lipofilní produkty nemohou být odstraněny těmito membránami, protože jsou zabudovány do micel, které jsou příliš velké na to, aby prošly membránou. Lipofilní produkty jsou proto odstraňovány přes filtr (Minekus 2015).

DGM (The Dynamic Gastric Model), neboli dynamický model žaludku, byl navržen pro *in vitro* simulaci *in vivo* procesu trávení potravy v žaludku. Jedná se o počítačem řízený model žaludku, který simuluje jak biochemické, tak mechanické procesy, které v žaludku probíhají během trávení v reálném čase. Mechanismus DGM lze rozdělit do dvou kroků. V prvním kroku dochází k napodobení nehomogenního promíchání potravy v žaludku prostřednictvím kontrakcí v nálevkovité části označené jako fundus. Kontrakce jsou vyvolávané tlakem vody obklopující prostor mezi vnější a vnitřní stěnou horní části. Maximální kapacita (800 ml) fundu byla zvolena tak, aby odpovídala objemu žaludku po přijetí velkého jídla. Z dávkovače plovoucím na hladině jsou do fundu přidávány žaludeční šťávy a enzymy. V druhém kroku dochází k přesunu potravy do části nazývané antrum. Antrum se skládá z pístu a barelu, jež svými pohyby zajišťují mechanické rozmělnění potravy, průchod a vyloučení tráveniny přes elastickou membránu (Thuenemann et al. 2015).

V DGM nejsou síly uplatňované k rozmělnění částic shodné s mechanismem žaludečních kontrakcí, proto byl vyvinut *in vitro* model žaludku HGS (The Human Gastric Simulator), který by měl lépe napodobovat peristaltické kontrakce, sekrece žaludku a vyprazdňování. Tento model je tvořen válcovitou, dole zúženou latexovou nádobou a soustavou válečků simulujících kontinuální kontrakce žaludeční stěny. Tento model má realisticky přibližovat *in vivo* síly působící na potravu v žaludku. Navíc síťovina z polyesteru o velikosti ok 1,5 mm umístěná do latexové nádoby napodobuje efekt vrátníku, kterým prochází pouze voda a malé částice. Do latexové komory je pomocí plastových trubiček dodávána simulovaná žaludeční šťáva. Doplnění šťáv zajišťuje peristaltické čerpadlo. 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 řídící zapnutí a vypnutí žárovek (Ferrua & Singh 2015).

ARCOL (umělé tlusté střevo) je fermentační model, který napodobuje procesy tlustého střeva a snaží se zajistit co nejpřesnější podmínky (pH, teplota, přítomnost mikrobioty atd.),

kteře ve střevě jsou. Čerstvé vzorky stolice zdravých dobrovolníků jsou smíseny s fosfátovým puřrem, filtrovány přes dvojitou vrstvu gázy a následně se tento filtrát naočkuje do fermentoru. Do ARCOL bioreaktoru se přidává kultivační médium, které napodobuje složení střevních tekutin a zároveň se průběžně odebírá filtrační medium. Konstantní teplota a pH se udržuje přidáváním NaOH a zahříváním vodního pláště. Je zde přítomný dialyzační systém, který využívá membrány z dutých vláken a udržuje vhodné koncentrace elektrolytů a metabolitů (Dupont et al. 2019).

SHIME (simulátor mikrobiálního ekosystému lidského střeva) je počítačově řízený model simulující mikrobiální prostředí a fyziologii trávicího traktu. Skládá se ze žaludku, tenkého střeva, vzestupného tračnicku, příčného tračnicku a sestupného tračnicku, přičemž do prvních dvou částí je přiváděno pomocí čerpadel médium. Do žaludku je přiváděn pepsin a do tenkého střeva pankreatické enzymy a žluč. Po trávení v žaludku a tenkém střevě se trávenina čerpá do vzestupného tračnicku, kde pokračuje trávení v tlustém střevě. U posledních tří částí modelu je za stálého míchání regulováno pH a objem, aby se co nejvíce podobaly *in vivo* podmínkám v různých částech trávicího traktu. Dojde k naočkování fekální mikrobiotou a poté dojde ke stabilizaci mikrobiální komunity, ale složení a funkčnost mikrobioty je v posledních 3 částech odlišná. Výhodou tohoto modelu je, že jako jeden z mála zahrnuje celý trávicí trakt (Van de Wiele et al. 2015).

Simgi (simulátor trávicího traktu) zahrnuje 5 vzájemně propojených oddílů – žaludek, tenké střevo a tři části tlustého střeva. Tyto oddíly určené pro trávení (žaludek a tenké střevo) a fermentaci (tlusté střevo) mohou fungovat buď společně, nebo mohou tyto procesy probíhat nezávisle. Žaludek se skládá ze dvou válcových plastových průhledných modulů obklopených silikonovou stěnou. Probíhá zde míchání potravy pomocí peristaltických pohybů. Ty jsou vytvářeny změnami tlaku vody, která proudí mezi silikonovou a plastovou částí. Obsahuje postranní otvory pro vstup potravin, žaludeční šťávy a kyseliny chlorovodíkové. Tenké střevo je skleněná dvouplášťová nádoba, kde se přijatý obsah ze žaludku promíchává s pankreatickou šťávou a žlučí. Po procesu trávení je obsah veden do tlustého střeva. Všechny tři oddíly tlustého střeva mají stejnou stavbu jako střevo tenké. Hodnoty pH se zde řídí přidáváním NaOH a kyselinou chlorovodíkovou (Barroso et al. 2015).

Pro mikrobiální metabolismus tlustého střeva se využívají fekální fermentační modely. Modely fermentace se skládají z chemostatů, kdy každý je naočkován fekální mikrobiotou v živném mediu a jsou provozované za fyziologických podmínek (teplota, pH, retenční čas, kultivační médium a anaerobní prostředí) (Payne et al. 2011). Fermentor bývá nejčastěji udržován na teplotě 37 °C. Anaerobní podmínky bývají udržovány kontinuálním tokem CO₂. Chceme-li minimalizovat znečištění substrátu, jsou často vzorky stolice odstředěny, aby se zbavily velkých částic. Navíc fermentace fekálního inokula v mediu usnadní adaptaci fekální mikrobioty v experimentálních podmínkách konkrétní oblasti střeva (Cinquin et al. 2004).

Složitost modelů se zvyšuje s počtem současně provozovaných chemostatů. Chemostaty od menších po větší jsou zařazeny do série, aby docházelo k postupnému doplňování média. Zahrnují růst čisté nebo smíšené bakteriální suspenze v mediu. U dávkových fermentačních modelů probíhá bez přidání živin. Jsou to uzavřené systémy zahrnující uzavřené lahve obsahující suspenze fekálního materiálu, udržované za anaerobních podmínek (Payne et al. 2011). Dávkové fermentační modely, které patří k nejjednodušším modelům, jsou omezeny na experimenty krátkodobé fermentace. Naopak kontinuální systémy mohou být provozovány

po delší dobu, typicky 2–4 týdny, za podmínek pseudo-ustáleného stavu (Berner et al. 2013). Mikrobiální růst v těchto systémech závisí na hustotě očkování a míře vyčerpání substrátu. Naočkované systémy s nízkou hustotou buněk při počáteční hojnosti přístupu živin, který se postupem času vyčerpává a společně s hromaděním toxických produktů má za následek zastavený růst. Experimenty, jako jsou mikrobiální metabolická modulace a hodnocení mikrobiální komunity, vyžadují kontinuální doplňování substrátu, protože vyčerpání substrátu omezuje provozní dobu fermentací a brání udržování ustálených podmínek *in vitro* (Payne et al. 2011).

Médium využívané ve fermentačních modelech se skládá z proteinových substrátů (kasein a pepton), komplexních sacharidů (pektin, xylan, arabinogalaktan a rezistentní škroby) a směsí solí a vitaminů (Gibson et al. 1988). Médium může dále obsahovat např. žaludeční mucin, trypton, guarové gummy, inulin, galaktooligosacharidy, kvasnicový extrakt nebo galaktonovou vodu (Newton et al. 2013).

Naočkování a kolonizace fermentačních systémů *in vitro* ovlivňuje reprodukovatelnost studií. Většina *in vitro* fermentačních modelů je naočkována kapalnou fekální suspenzí od jednotlivce nebo smíšenou stolicí od několika dárců. V posledním případě se vzorky použijí k naočkování vsádkového fermentoru k výrobě standardizovaného inokula, které se skladuje zmražené. Naočkování tekutou fekální suspenzí vede k vytvoření křehké komunity kvůli nedostatku biofilmových stavů bakteriálních populací ve spojení s kontinuálním vymýváním méně kompetitivních bakterií. Aby se tento problém vyřešil, byl vyvinut proces imobilizace pro zachycení fekální mikrobioty ve smíšených gelových kuličkách xanthan-gellanové gummy, aby byla zachována mikrobiální diverzita po dlouhou dobu kontinuálních fermentací tlustého střeva a bylo dosaženo podobně vysokých hodnot hustoty buněk jako v tlustém střevě. Použití imobilizované fekální mikrobioty umožňuje vytvářet samostatné kontinuální fermentační systémy charakterizované dlouhodobou funkčností. Je možné stabilně a reprodukovatelně kultivovat složité intestinální komunity ve více reaktorech, což umožňuje paralelní studium různých ošetření ve srovnání s kontrolním reaktorem. Aby se usnadnila reprodukovatelnost experimentů, nejnovější vývoj se zaměřuje na inokulaci fermentačních modelů definovanými populacemi lidských střevních mikroorganismů představovaných běžnými populacemi sacharolytických a amino kyselin fermentujících v tlustém střevě (Berner et al. 2013; Verhoeckx et al. 2015).

Složení vzorků stolice je velice variabilní a jsou zde velké individuální rozdíly vzhledem k rozdílnému věku, pohlaví, stravě nebo etnickému původu. Nejde pouze o variabilitu mezi jednotlivci, ale v rámci jednoho dárce může čas přispět k odlišnému složení mikrobioty a metabolické aktivity (Pham & Mahojeri 2018).

Tyto modely se využívají k dosažení složitosti skutečné *in vivo* situace. Experimentování v těchto modelech je téměř neomezené a můžeme vyhodnocovat jednu nebo více složek stravy a jejich dopad na jednotlivé střevní populace a následné změny jejich metabolismu (Payne et al. 2011).

4 Metodika

4.1 Chemikálie

NH_4HCO_3 , NaHCO_3 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, trypton, glukóza, maltóza, resazurin, hemin, vitamin K1, 1M NaOH, $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, plynný dusík, 6M HCl, cystein hydrochlorid, kvasnicový extrakt, kyselina ferulová, dimethylsulfoxid (DMSO), azid sodný (NaN_3), 3-trimethylsilylpropionan sodný (TSP), 1.5M fosfátový pufr.

4.2 Fermentace

4.2.1 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 K1 (0,5 mg/l) a 5,07 mg heminu (5 mg/l) rozpuštěných v 450 ml destilované vody. Dále z 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 , doplněné destilovanou vodou do objemu 25 ml a skladované při teplotě 4 °C po dobu maximálně 2 měsíců), 225 ml makrominerálního roztoku (5,7 g Na_2HPO_4 , 6,2 g KH_2PO_4 , 0,3 g MgSO_4 , doplněné destilovanou vodou do objemu 1 litr, skladované při teplotě 4 °C po dobu maximálně 1 měsíce), 225 ml CO_3 pufrovacího roztoku (4 g NH_4HCO_3 , 35 g NaHCO_3 doplněné destilovanou vodou do objemu 1 litr a skladované při teplotě 4 °C po dobu maximálně 1 měsíce) a 1,125 μl 0,1% roztoku resazurinu.

4.2.2 Redukční roztok

Redukční roztok byl připraven z 312,5 mg cystein hydrochloridu, 2 ml 1M NaOH, 101,5 mg Na_2S a 50 ml destilované vody. Byl vždy připravován čerstvý před experimentem.

4.2.3 Sodno-fosfátový pufr

Sodno-fosfátový pufr vznikl smícháním 1/15M KH_2PO_4 a 1/15M Na_2HPO_4 (pH 7 při teplotě 20 °C). Tento pufr jsme následně skladovali při teplotě 4 °C po dobu maximálně 1 měsíce.

4.2.4 Odběr a příprava vzorků stolice

Vzorky stolice byly odebrány od 20 zdravých dobrovolníků dvou věkových skupin (do 45 let a nad 70 let). Dobrovolníci byli bez dietních omezení a trávicích obtíží. Odběr proběhl do jednorázových sad a vzorky stolice byly uzavřeny do sáčku s anaerogenem (Biomérieux, Lyon, Francie). Následně byly zpracovány do 2 hodin od odběru. Vzorek čerstvé stolice (24 g) od dárce byl společně homogenizován se sodno-fosfátovým pufrům (75 ml) ve stomacheru (Laboratory Blender, Stomacher® 400 Circulator, EU) a následně přefiltrována pře nylonový filtr. Výsledná fekální směs měla koncentraci 24 %.

4.2.5 Příprava 96-jamkových deep-well destiček

Sodno-fosfátový pufr a fermentační médium byly přivedeny na 7 minut k varu a následně zchlazeny na teplotu 37 °C za stálého přístupu dusíku. Pomocí 6M HCl bylo upraveno pH na 7. Do 96-jamkových deep-well destiček bylo napipetováno 835 µl fermentačního média a 40 µl redukčního roztoku. Následně byly destičky zatavené do vakuovacích pytlíků spolu s anaerogenem. Takto připravené destičky byly uchovány při 4 °C do dalšího dne.

4.2.6 Příprava roztoku kyseliny ferulové

Zásobní roztok kyseliny ferulové o koncentraci 10 mg/ml byl připraven rozpuštěním v DMSO. Pracovní roztok byl vytvořen rozpuštěním 500 µl zásobního roztoku kyseliny ferulové v 2000 µl fermentačního média. Koncentrace kyseliny ferulové v pracovním roztoku odpovídala 2 mg/ml.

4.2.7 Proces fermentace

Do destiček připravených z předchozího dne bylo přidáno 100 µl fekální suspenze, nebo sodno-fosfátového pufru pro kontrolní vzorek a 25 µl roztoku kyseliny ferulové (konečná koncentrace 50 µg/ml) nebo DMSO jako kontrola. Opět byly destičky zatavené do vakuovacích pytlíků společně s anaerogenem a umístěny do inkubátoru (37 °C, 100 rpm). Vzorky byly postupně odebírány z destiček v časech 0, 2, 4, 8 a 24 hodin. V těchto časech bylo do 1,5 ml mikrozkušavek Eppendorf z každé jamky odebráno 950 µl vzorku a smíšeno s 50 µl azidu sodného (finální koncentrace NaN₃ ve vzorcích byla 1,5 mg/ml). Takto připravené vzorky byly skladovány při -80 °C až do konečné analýzy a skladovány v termostatu při teplotě 37 °C v anaerobním prostředí.

4.2.8 Příprava vzorků pro NMR analýzu

Před vlastním měřením byly vzorky rozmrazeny za pokojové teploty, následně zhomogenizovány na vortexu a zcentrifugovány (4 °C, 15000 rpm, 10 min), abychom oddělili pevnou a kapalnou fázi. Poté bylo odebráno 600 µl, k nimž bylo přidáno 66,66 µl NMR pufru (1.5M fosfátový pufr, pH 7,4, 0,2% azid sodný a 5mM TSP v D₂O). Roztok byl znovu zcentrifugován (4 °C, 5 min, 15 000 rpm) a 600 µl supernatantu bylo přepipetováno do NMR kyvet.

4.2.9 NMR analýza

Spektra byla měřena na spektrometru Bruker Avance III vybaveném broadband observation sondou (BBFO) SmartProbe s gradienty v ose Z (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Německo), který pracuje 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 noesy1d při 4,704 ppm. Pro každý vzorek byl použit jednodimenzionální ¹H experiment s následujícími parametry: počet skenů NS 64, počet datových bodů 64k 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 zpracován 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.

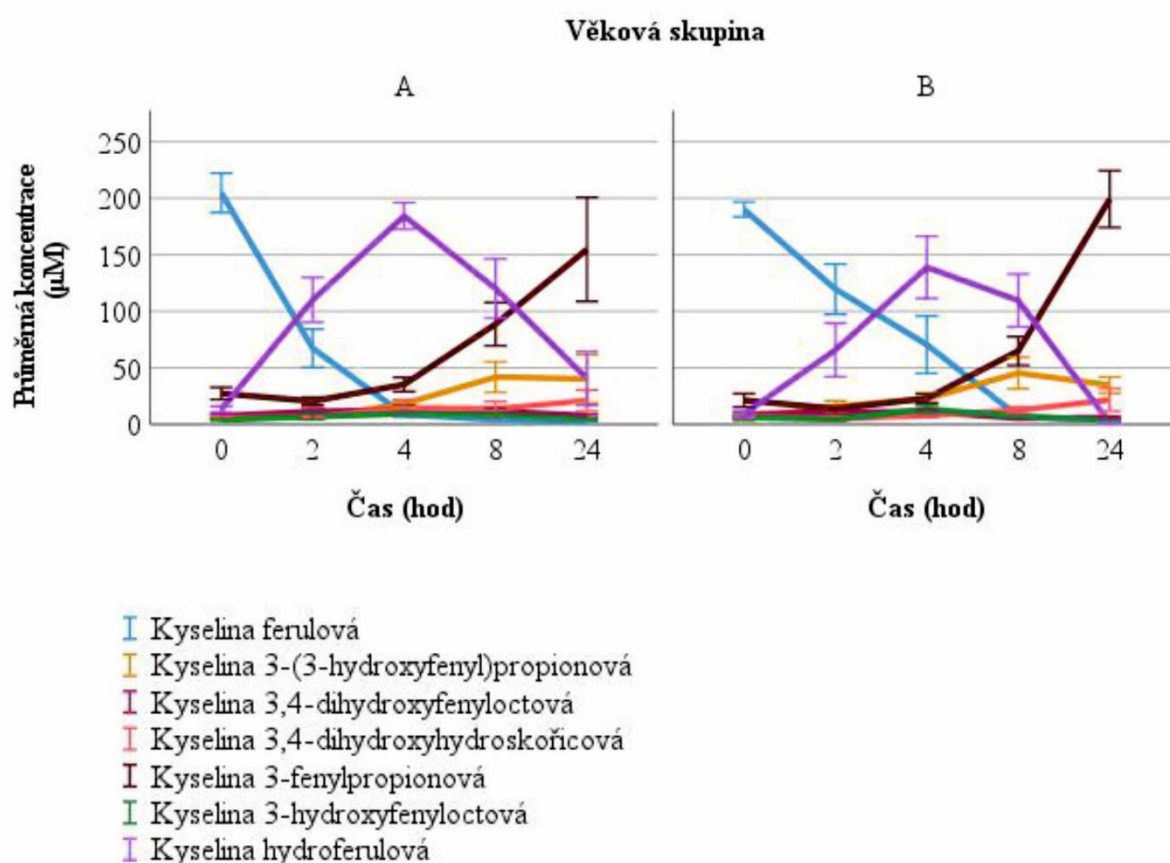
4.2.10 Statistická analýza

Statistická analýza byla provedena v programech Statistica a IBM SPSS Statistics 27. S celkovým počtem 20 vzorků byl proveden dvouvýběrový t-test a párový t-test.

5 Výsledky

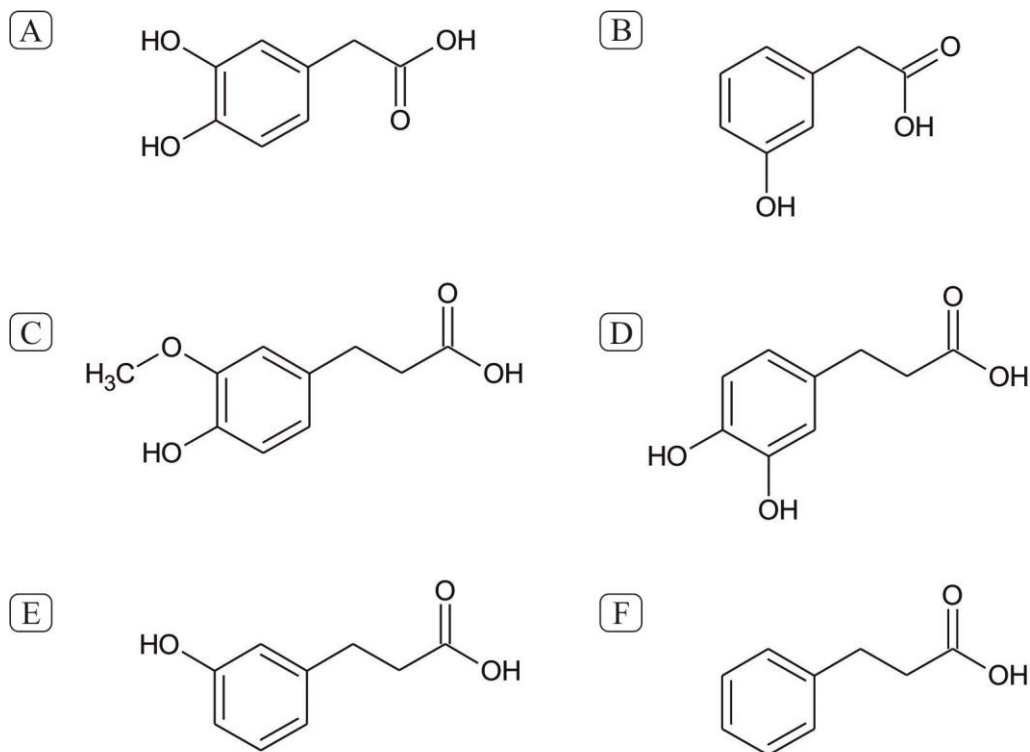
Byl sledován vznik a vývoj metabolitů kyseliny ferulové u 20 dárců dvou věkových skupin. První skupinu (A) tvořili dárce do 45 let, druhou skupinu (B) dárce nad 70 let. Kyselina ferulová se během fermentace pomocí střevní mikrobioty rozkládala na jednotlivé metabolity. V analyzovaných vzorcích bylo pomocí programu Chenomx 8.5 identifikováno 6 metabolitů. Mezi identifikovanými metabolity byly kyselina 3,4-dihydroxyhydroskořicová, kyselina 3-hydroxyfenyloctová, kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová, kyselina 3-fenylpropionová, kyselina 3-(3-hydroxyfenyl)propionová a kyselina hydroferulová. Byly pozorovány rozdíly ve složení a spektru metabolitů u různých dárců.

Obrázek č. 9 znázorňuje graf závislosti koncentrace kyseliny ferulové a jejích metabolitů na čase v ošetřené variantě. V grafu je srovnávána věková skupina A a věková skupina B. Grafické znázornění naznačuje, že metabolismus testovaných látek probíhá u dárců odlišným způsobem a různou mírou rozkladu.



Obrázek č. 9: Graf závislosti koncentrace kyseliny ferulové a jejích metabolitů na čase mezi věkovými skupinami v ošetřené variantě, $N=20$

Na obrázku č. 10 jsou zobrazeny strukturální vzorce jednotlivých metabolitů kyseliny ferulové.

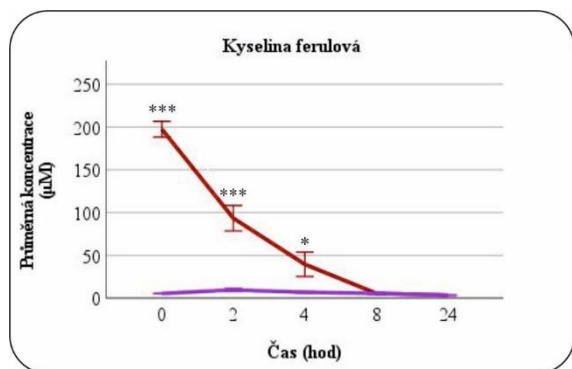


Obrázek č. 10: Strukturální vzorce jednotlivých metabolitů kyseliny ferulové; A: kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová; B: kyselina 3-hydroxyfenyloctová; C: kyselina hydroferulová; D: kyselina 3,4-dihydroxyhydroskořicová; E: kyselina 3-(3-hydroxyfenyl)propionová; F: kyselina 3-fenylpropionová

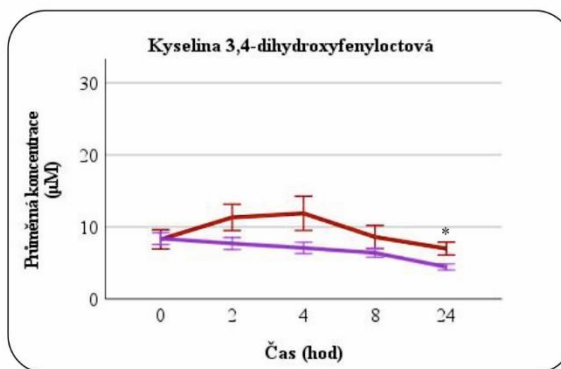
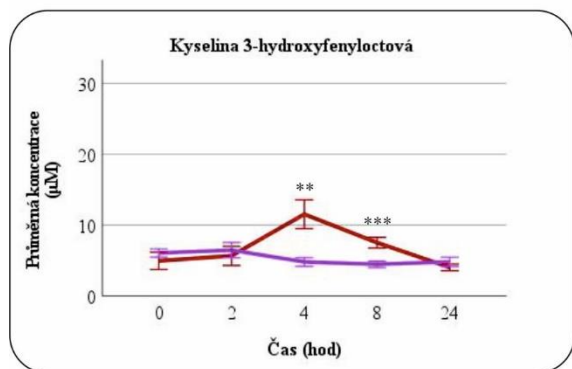
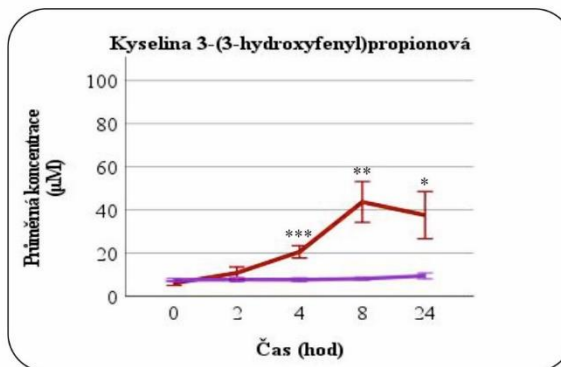
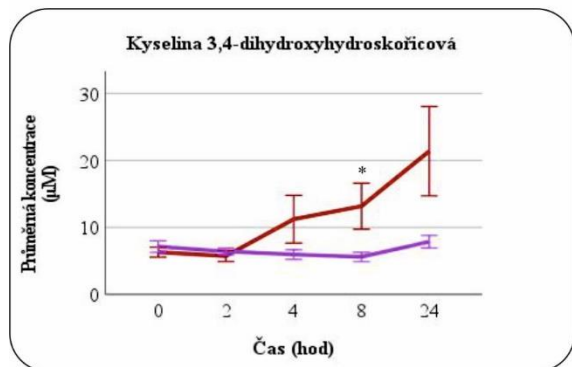
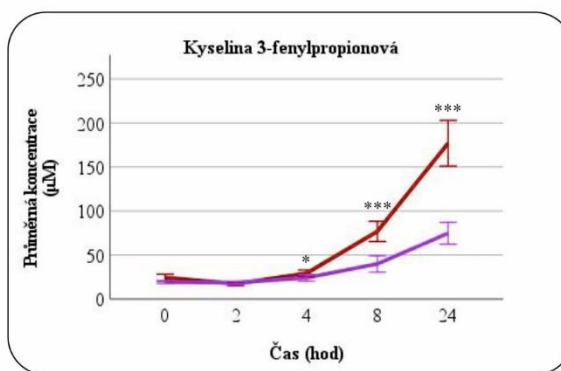
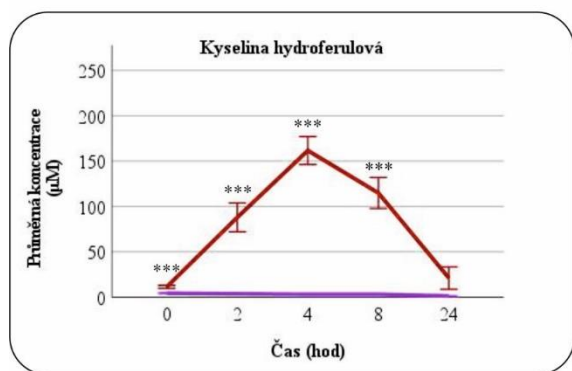
Obrázek č. 11 graficky znázorňuje závislost koncentrace kyseliny ferulové a jednotlivých metabolitů na čase od všech dárců v ošetřené variantě a kontrole.

Množství kyseliny ferulové bylo podle očekávání nejvyšší v čase 0 hodin a dále s postupem času klesalo.

V případě metabolitů nejvyšších intenzit dosahovala kyselina hydroferulová. Její koncentrace poměrně prudce rostla od času 0 hodin do času 4 hodiny, dosáhla maxima v čase 4 hodiny a poté opět její koncentrace klesala. Koncentrace kyseliny 3-fenylpropionové byla v čase 0–4 hodiny stejná, její množství se v čase 4 hodiny začalo zvyšovat a maxima dosáhla v čase 24 hodin. Toto platilo jak pro ošetřenou variantu, tak pro kontrolu, ovšem v kontrole v nižších koncentracích. Koncentrace kyseliny 3-(3-hydroxyfenyl)propionové stoupala v čase rovnoměrně, svého maxima dosáhla v čase 8 hodin a následně její koncentrace klesala. Koncentrace kyseliny 3,4-dihydroxyhydroskořicové se také lineárně zvyšovala v čase a dosáhla svého maxima ve 24 hodinách. Nejnižších intenzit dosahovala kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová a kyselina 3-hydroxyfenyloctová. Množství kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové se od času 0 hodin do času 4 hodiny se zvyšovalo a poté postupně zase klesalo. Kyselina 3-hydroxyfenyloctová dosáhla nejvyšší koncentrace v čase 4 a následně klesala.

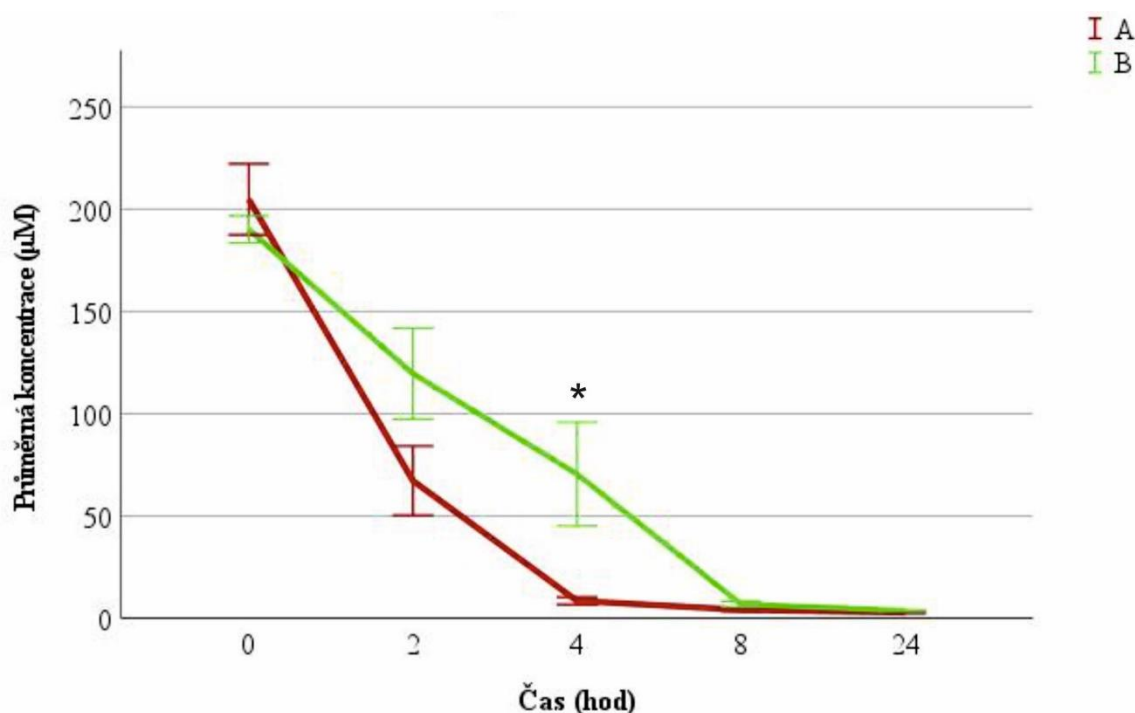


I Ošetřená varianta
II Kontrola



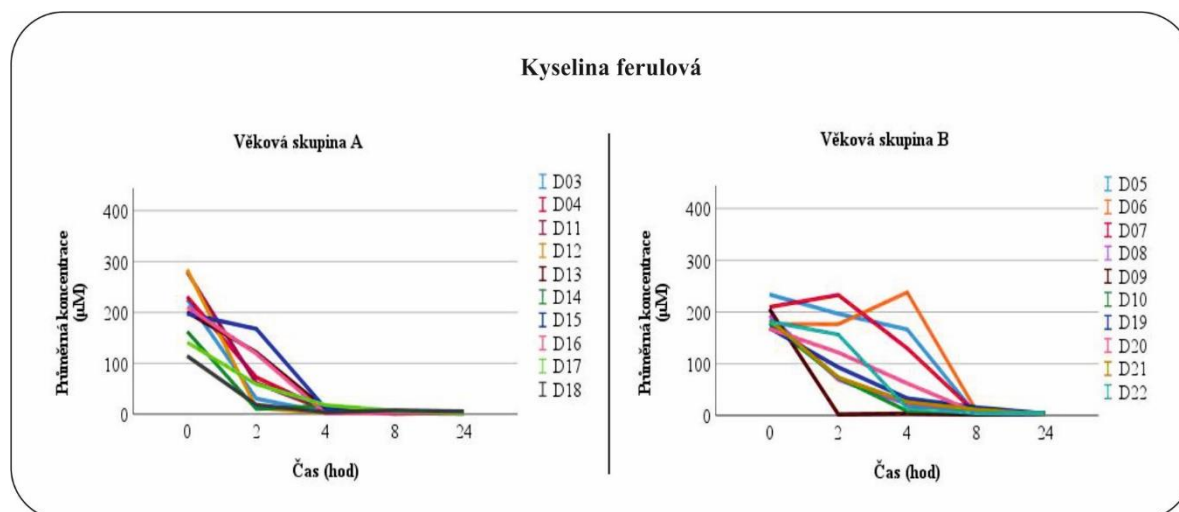
Obrázek č. 11: Graf závislosti koncentrace kyseliny ferulové a jejích metabolitů na čase v ošetřené variantě a v kontrole, N=20; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Na obrázku č. 12 je graficky znázorněna závislost koncentrace kyseliny ferulové na čase v ošetřené variantě. Byl pozorován statisticky významný rozdíl v intenzitě metabolismu mezi věkovou skupinou A a věkovou skupinou B, kdy u skupiny B byl metabolismus pomalejší.



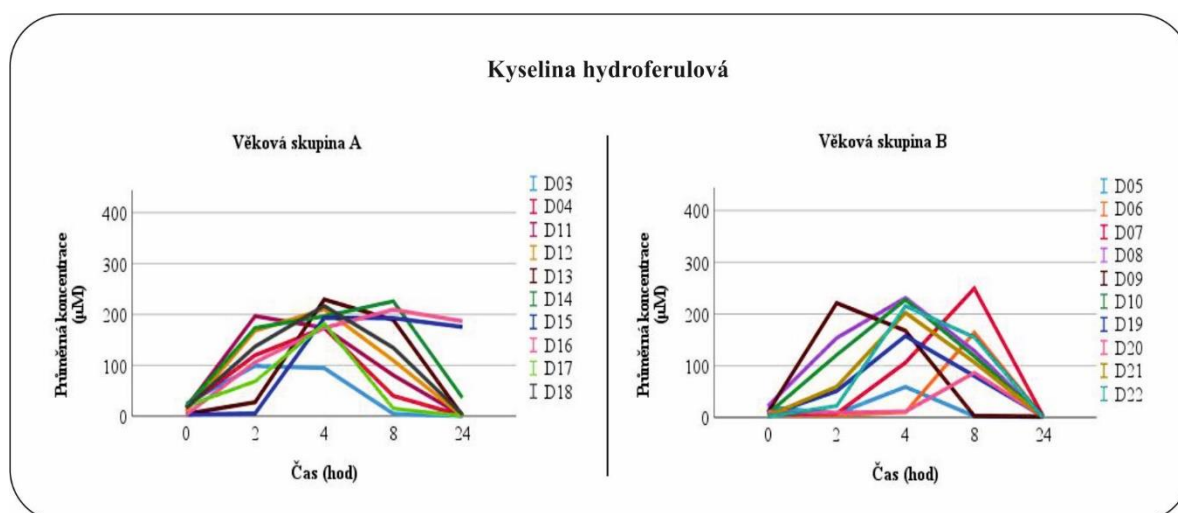
Obrázek č. 12: Graf závislosti kyseliny ferulové na čase mezi věkovými skupinami A a B v ošetřené variantě, $N=20$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Na obrázku č. 13 je graficky znázorněna rozdílná koncentrace kyseliny ferulové v závislosti na čase u skupiny A a B. Intenzita metabolismu kyseliny ferulové se u jednotlivých dárců lišila. Dárce D15 z věkové skupiny A metabolizoval pomaleji než tomu bylo u ostatních dárců. U věkové skupiny B byly viditelnější interindividuální rozdíly. U dárců D6 a D7 došlo nejprve k nárůstu koncentrace, a teprve poté se začala koncentrace snižovat. V případě dárce D9 byly hodnoty minimální již v čase 2 hodiny. U ostatních dárců se množství postupně od času 0 do 24 hodin snižovalo.



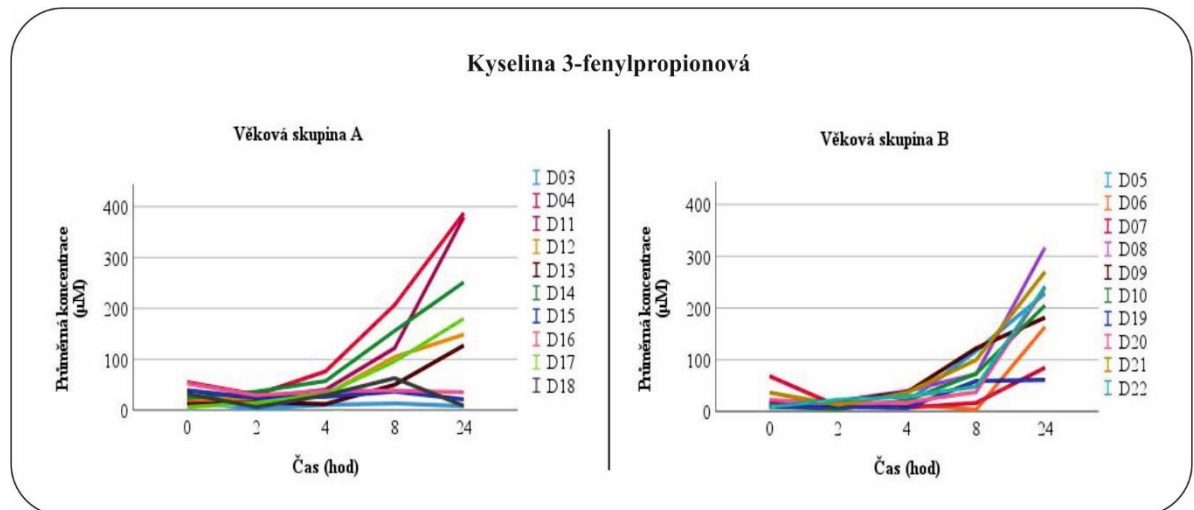
Obrázek č. 13: Graf závislosti koncentrace kyseliny ferulové na čase podle jednotlivých dárců z věkové skupiny A a B, N=20

Na obrázku č. 14 je graficky znázorněna rozdílná koncentrace kyseliny hydroferulové v závislosti na čase u skupiny A a B. U této kyseliny jsou patrné výrazné rozdíly v intenzitě metabolismu. V případě věkové skupiny A se vymykají 2 dárci, konkrétně D15 a D16. U ostatních dárců byla koncentrace v čase 24 hodin nižší než 10 µM, ale u těchto dárců dosahovala koncentrace vysokých hodnot. Konkrétně 175,5 µM u dárce D15 a 186,8 µM u dárce D16. U věkové skupiny B nejvyšší hodnoty dosáhl dárce D7 v čase 8 hodin s koncentrací 249,6 µM. Nejnižší maximum bylo u dárce D5 v čase 4 hodiny s koncentrací 59,3 µM. Všichni dárci měli v čase 24 hodin shodně koncentraci blížíci se 0.



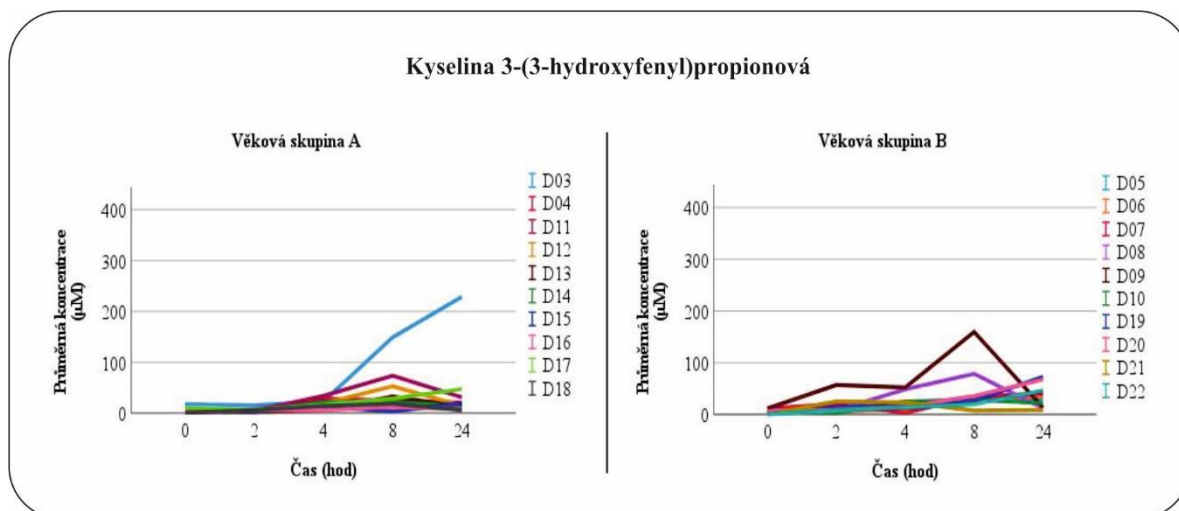
Obrázek č. 14: Graf závislosti koncentrace kyseliny hydroferulové na čase podle jednotlivých dárců z věkové skupiny A a B, N=20

Na obrázku č. 15 je graficky znázorněna rozdílná koncentrace kyseliny 3-fenylpropionové v závislosti na čase u skupiny A a B. U této kyseliny se vyskytovali producenti i neproducenti, neboli ti, kteří tvořili jen minimální množství. Ve věkové skupině A byli dárce co neprodukovali, nebo produkovali v různých intenzitách. Dárce D4 a D11 dosahovali v čase 24 hodin vysokých hodnot, konkrétně 387,6 μM u dárce D4 a 379,8 μM u dárce D11. U věkové skupiny B byli všichni producenti, v čase 24 hodin dosáhl nejnižší hodnoty 61,3 μM dárce D19, nejvyšší hodnotu 317 μM měl dárce D8.



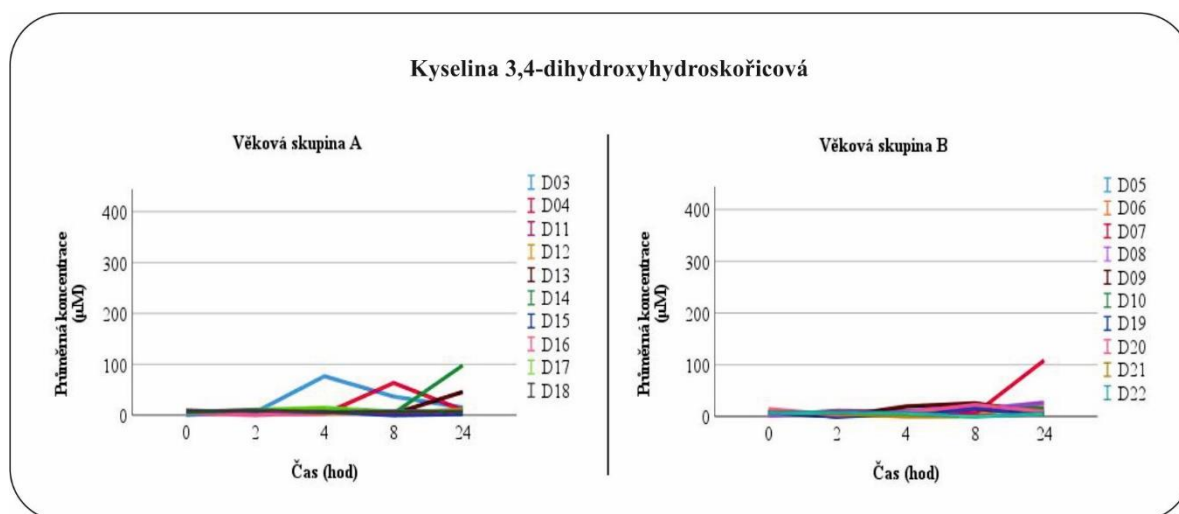
Obrázek č. 15: Graf závislosti koncentrace kyseliny 3-fenylpropionové na čase podle jednotlivých dárců z věkové skupiny A a B, N=20

Na obrázku č. 16 je graficky znázorněna rozdílná koncentrace kyseliny 3-(3-hydroxyfenyl)propionové v závislosti na čase u skupiny A a B. Koncentrace u dárců nepřesahovala hodnotu 100 μM . Ve věkové skupině A se vymykal dárce D3, kdy koncentrace začala v čase 4 hodiny prudce růst a maxima dosáhla v čase 24 hodin s hodnotou 228,8 μM . U věkové skupiny B tomu bylo podobně, vymykal se dárce D9, jehož koncentrace začala růst v čase 4 hodiny, maxima (159,7 μM) dosáhla v 8 hodinách a poté koncentrace klesala.



Obrázek č. 16: Graf závislosti koncentrace kyseliny 3-(3-hydroxyfenyl)propionové na čase podle jednotlivých dárců z věkové skupiny A a B, N=20

Na obrázku č. 17 je graficky znázorněna rozdílná koncentrace kyseliny 3,4-dihydroxyhydroskořicové v závislosti na čase u skupiny A a B. U této kyseliny převažovali neproducenti, ale jsou zde 4 dárci z věkové skupiny A a jeden z věkové skupiny B, kteří byli producenti. U žádného z dárců nepřekračovala koncentrace 100 μM, vyjma dárce D7 z věkové skupiny B, jehož hodnota dosahovala v čase 24 hodin 108,4 μM.



Obrázek č. 17: Graf závislosti koncentrace kyseliny 3,4-dihydroxyskořicové na čase podle jednotlivých dárců z věkové skupiny A a B, N=20

6 Diskuze

Cílem této diplomové práce bylo stanovit hlavní katabolity kyseliny ferulové v modelu tlustého střeva s využitím stolice dárců ze dvou věkových skupin (do 45 let a 70 let a více). Kyselina ferulová byla metabolizována v různé intenzitě a s různým spektrem vzniklých metabolitů. Rozdíly byly pozorovány nejen mezi vzorky stolice z různých věkových skupin, ale také mezi vzorky získaných od různých dárců v rámci věkových skupin.

Řada polyfenolů je, i přes jejich přijímané množství v rostlinné stravě, málo biologicky dostupná. V průběhu trávení jsou špatně vstřebávány, protože podléhají rozsáhlému metabolismu trávicími enzymy a střevní mikrobiotou. Mezi tyto polyfenoly patří oligomerní a polymerní proanthokyanidiny, estery kyseliny hydroxyskořicové (kam patří právě kyselina ferulová) a lignany. V tlustém střevě jsou metabolizovány střevní mikrobiotou a vytvářejí řadu jednodušších, lépe vstřebatelných sloučenin. Stupeň degradace polyfenolů ovlivňuje koncentrace substrátu a individuální změny ve složení střevní mikrobioty. Vzniklé jednoduché fenolové sloučeniny mohou být považovány za biomarkery metabolismu tlustého střeva (Sánchez-Patán et al. 2011). Metabolismus polyfenolů v tlustém střevě obecně zahrnuje biotransformaci na jednoduché fenoly, fenolové kyseliny, aromatické látky a laktony s různým stupněm hydroxylace a délky postranního řetězce (Cardona et al. 2013). Působením mikrobioty mohou být metabolity polyfenolů uvolňovány z matrice a následně absorbovány do enterocytů pasivní difúzí a vstoupit tak do jater, kde jsou dále metabolizovány enzymy před dalším vstupem do oběhu nebo vyloučením močí. (Sánchez-Patán et al. 2011).

Hlavní metabolické cesty kyseliny ferulové jsou redukce, demetylace a dehydroxylace na C4, dehydroxylace na C3 se vyskytuje jen zřídka (Aura et al. 2002). Zdá se, že biologická dostupnost kyseliny ferulové je určena jejím uvolňováním z potravinářské matrice. V případě otrub je kyselina ferulová vázána na arabinoxylany a další polysacharidy buněčné stěny, které jsou schopné odolávat trávení v horním GIT. V případě výskytu volné kyseliny ferulové, je její biologická dostupnost a absorpce o poznání vyšší, ovšem volná kyselina ferulová se vyskytuje v potravě minimálně (Mateo Anson et al. 2009). Hladina nalezené kyseliny ferulové ve stolici je zanedbatelná. To naznačuje, že tato sloučenina je buď absorbována gastrointestinálním traktem, nebo rozsáhle katabolizována mikrobiotou přítomnou ve střevě. Pokud se ovšem v potravě vyskytnou obiloviny, je vylučování této látky stolicí zvýšeno. To naznačuje, že absorpce této sloučeniny je snížena, pokud je přítomna ve složité matrici, jako jsou například právě cereálie. V plazmě byla detekována až po enzymatickém ošetření, což naznačuje, že kyselina ferulová zde cirkuluje pouze v konjugované formě. Vylučování kyseliny ferulové močí je úměrné požití dávce (Adam et al. 2002).

Námi sledovanou látkou byla tedy kyselina ferulová a její katabolismus. U všech dárců došlo v různých časových intervalech k postupnému snižování koncentrace. U věkové skupiny A se koncentrace snižovala rychleji než u skupiny B, což naznačuje rychlejší metabolismus u věkové skupiny do 45 let. V případě věkové skupiny B jsou patrné větší odchylky, což je pravděpodobně způsobeno většími rozdíly mezi dárci s ohledem na odlišné stravovací návyky či zdravotní stav. Průběh katabolismu kyseliny ferulové byl ovlivněn individuálními rozdíly v bakteriálním složení vzorků stolice. Podle Biagi et al. (2010) snížená střevní motilita má za následek pomalejší střevní průchod a snížené vylučování střevních bakterií mění nepříznivým způsobem střevní fermentační procesy. To ovlivňuje homeostázu

bakteriálního ekosystému ve střevním traktu. Druhové složení je u staších dospělých (60+) podobné jako u mladších (převládají *Firmicutes* a *Bacteroidetes*), ale zvyšují se počty bacilů a mikrobiota je obohacena o *Proteobacteria*, což jsou organismy, které mohou vyvolat různé patologické změny. Dalším znakem stárnutí je přibývání fakultativních anaerobů. U některých starších dospělých s přibývajícím věkem docházelo k poklesu bakteriálních skupin patřících k *Bacteroidetes*, u některých zůstala tato populace nezměněna. Vysvětlení tohoto nesouladu může spočívat v demografických a geografických rozdílech mezi studovanými jedinci. O těchto rozdílech se uvádí, že silně ovlivňují změny ve složení střevní mikrobioty. Dalším faktorem jsou velmi individuální stravovací návyky starších lidí.

U dárců D6 a D7 z věkové skupiny B došlo k nárůstu koncentrace kyseliny ferulové, což bylo pravděpodobně způsobeno tím, že se kyselina ferulová navázala na matrici a následně došlo k jejímu uvolnění. V čase 24 h je podle nízkých koncentrací patrné, že došlo ke kompletnímu katabolismu kyseliny ferulové u všech dárců.

V námi analyzovaných vzorcích jsme identifikovali 6 metabolitů. Jsou to kyselina hydroferulová, kyselina 3,4-dihydroxyhydroskořicová, kyselina 3-hydroxyfenyloctová, kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová, kyselina 3-fenylpropionová a kyselina 3-(3-hydroxyfenyl)propionová. Zhao & Moghadasian (2008) popisují stejně jako v naší studii přeměnu kyseliny ferulové na kyselinu hydroferulovou a *m*-hydroxyfenylpropionovou. Mezi dalšími metabolity vzniklé z této kyseliny zmiňují vanilloylglycin, feruloylglycin, sulfát kyseliny ferulové nebo glukoronid kyseliny ferulové. Ou & Kwok (2004) ve své studii popsali transformaci kyseliny ferulové na vanilin. První cestou je dekarboxylace kyseliny ferulové dekarboxylázou za vzniku 4-vinylguajakolu a poté vanilinu. Druhým je redukce kyseliny ferulové na kyselinu dihydroferulovou, z níž se tvoří kyselina vanilová a vanilin. Karmakar et al. (2000) zmiňují ve své studii, že se kyselina ferulová kromě vanilinu a kyseliny vanilové odbourává za vzniku kyseliny protokatechové. Mathew & Abraham (2006) uvádí, že se kyselina ferulová přeměňuje na kyselinu kávovou. Může se také transformovat na kyselinu 3-methoxy-4-hydroxyfenylpropionovou anaerobními bakteriemi. Střevní mikrobiota potkanů dokáže přeměnit kyselinu ferulovou na kyselinu dihydrokávovou a 4-ethylcatechol. Liu et al. (2019) popisují ve své studii ferulát sodný, rozpustnou formu kyseliny ferulové. Tato látka má pozitivní vliv na srdeční funkce a podílí se na prevenci kardiovaskulárních onemocnění prostřednictvím regulace střevní mikrobioty. My jsme metabolity zmíněné v těchto studiích neidentifikovali, protože se v našich vzorcích nevyskytovaly vůbec, nebo jen v malém zanedbatelném množství. Je to pravděpodobně způsobeno rozdíly ve složení střevní mikrobioty u různých jedinců, jelikož to se projevuje v rozdílném poměru vznikajících metabolitů u jednotlivých jedinců.

Nejvýznamnějším metabolitem kyseliny ferulové je kyselina hydroferulová. V čase 0 h byly koncentrace velice nízké a poté začali stoupat. V čase 24 hodin byla kyselina hydroferulová už plně metabolizována a koncentrace tedy dosahovala nízkých hodnot. Časy, ve kterých bylo dosaženo maximálních hodnot, se mezi jednotlivými dárci lišily. U kyseliny hydroferulové se v případě věkové skupiny A liší 2 dárci, konkrétně dárci D15 a D16. U obou dárců zůstala koncentrace této látky v čase 24 hodin na vysoké hladině. Naopak tomu bylo u ostatních dárců této skupiny, u nich koncentrace klesala směrem k nule. Důvodem může být rozdílné složení střevní mikrobioty dárců a rozmanitost bakteriálních druhů v trávicím traktu. Kyselina hydroferulová by v tomto množství mohla převzít efekt a vyznačovat se

biologickými účinky kyseliny ferulové. Jakmile je kyselina ferulová uvolněna střevní mikrobiotou z buněčné stěny, může být dále metabolizována hydrogenací na *p*-nenasycené vazby, demetylací a selektivní dehydroxylací na C4 za vzniku dalších fenolových metabolitů. Kyselina hydroferulová vzniká další redukcí dvojnásobné vazby kyseliny ferulové a následně, pokud vstoupí do cyklu β -oxidace, může dále produkovat kyselinu vanilovou (Rechner et al. 2001).

Množství kyseliny 3-(3-hydroxyfenyl)propionové převyšující o mnoho ostatní dárce, se vyskytuje u dárce D3. Podobně tomu je u kyseliny 3,4-dihydroxyhydrokskořicové, kdy koncentrace v čase 2 hodiny oproti ostatním rychlým způsobem vzrostla. Ale naopak u kyseliny 3-fenylpropionové a hydroferulové byla koncentrace mnohem nižší než u jiných dárců. Důvodem výrazné odlišnosti tohoto dárce může být jeho nízký věk (12 let), ostatní dárce byli dospělí nad 24 let. To může svědčit o rozdílném metabolismu u dětí a dospělých, pro ověření této hypotézy by ovšem byla potřeba testovat více dárců z věkové skupiny do 15 let a porovnat výsledky s dospělými. Hollister et al. (2015) uvádí, že dětský střevní mikrobiom je oproti dospělému obohacen o *Bifidobacterium spp.*, *Faecalibacterium spp.* a *Lachnospiraceae spp.* Z funkčního hlediska střevní mikrobioty byly detekovány rozdíly s ohledem na množství genů zapojených do syntézy vitaminů, degradace aminokyselin nebo oxidační fosforylace. Střevní mikrobiom zdravých předpubertálních dětí je druhově bohatý a funkčně komplexní. Převládají v něm *Bacteroidetes* a *Firmicutes* a v průměru obsahuje významně větší množství *Firmicutes* a *Actinobacteria* než jsou obvykle pozorovány u zdravých dospělých. U dětí se také nenachází tak často jako u dospělých metabolické dysfunkce či záněty, které mají vliv na metabolismus látek ve střevě.

U kyseliny 3-fenylpropionové se dárce D4 a D11 v čase 24 hodin liší vyšší koncentrací oproti ostatním dárcům. To může způsobovat rozdílné složení bakteriálních druhů ve vzorcích stolice. Jednou z metabolických cest kyseliny ferulové je dehydroxylace. Výsledným produktem dehydroxylace je pak kyselina 3-fenylpropionová. Ta, tak jako kyselina 3-hydroxyfenyloctová, může vznikat jak z kyseliny ferulové, tak i z dalších polyfenolů, například flavanonu hesperidinu. Metabolismem hesperidinu vznikne v tlustém střevě kyselina 3,4-dihydroxyfenylpropionová, která se dále dehydroxyluje na 3-hydroxyfenylpropionovou kyselinu (Aura et al. 2002).

U kyseliny 3,4-dihydroxyhydrokskořicové se u obou věkových skupin nevyskytují takové rozdíly mezi dárce jako je tomu u jiných metabolitů. Pouze 4 jedinci z věkové skupiny A a jeden z věkové skupiny B ji produkují. Důvodem by mohla být struktura testované látky, nebo schopnost této kyseliny odolávat mikrobiálnímu rozkladu. Dárce D7 z věkové skupiny B měl vyšší koncentraci v čase 24 hodin než ostatní. Lišil se také u kyseliny hydroferulové, kdy měl odlišný průběh metabolismu této látky. Důvodem může být fakt, že tento dárce užíval 2 měsíce před odběrem antibiotika, která mohou změnit průběh metabolismu látek. Modi et al. (2014) a Panda et al. (2014) ve svých studiích uvádí, že antibiotika mění taxonomickou, genomickou a funkční kapacitu lidské střevní mikrobioty. Antibiotika se širokým spektrem snižují bakteriální rozmanitost a umožňují pronikání patogenních organismů do těla. Léčba antibiotiky znamená významnou změnu střevní mikrobioty a pokles mikrobiální diverzity v zažívacím traktu až o jednu čtvrtinu. Mikrobiota se do stavu před léčbou vrací i několik týdnů po ukončení léčby.

7 Závěr

Cílem práce bylo stanovit hlavní katabolity kyseliny ferulové v modelu tlustého střeva s využitím stolice dárců ze dvou věkových skupin (do 45 let a 70 let a více).

Byly stanoveny dvě hypotézy. První hypotézou je, že kyselina ferulová bude mikrobiálně transformována mikrobiotou tlustého střeva. Druhá hypotéza zní, že katabolity kyseliny ferulové se budou mezi dvěma sledovanými věkovými skupinami lišit.

Kyselina ferulová se během naší studie rozložila na 6 zjištěných metabolitů střevní mikrobiotou. Znamená to tedy, že první stanovená hypotéza byla potvrzena.

Katabolity kyseliny ferulové se mezi dvěma sledovanými skupinami lišily a podařilo se statisticky prokázat rozdílné koncentrace u jednotlivých metabolitů. Ale vzhledem k malému počtu subjektů ke studii (N=20) z různých prostředí a s různým stylem života je toto neporovnatelné. Druhou stanovenou hypotézu tedy nemůžeme potvrdit ani vyvrátit.

Analýza fekálních vzorků pomocí NMR poskytuje skvělou příležitost pro pochopení interakcí mezi hostiteli a střevní mikrobiotou. Ovšem pro přesnější výsledky by bylo vhodné provést sekvenační analýzu a konkrétně stanovit, jaké bakterie se ve stolici nachází. Dále by bylo vhodné otestovat biologickou aktivitu jednotlivých metabolitů.

8 Literatura

- Adam A, Crespy V, Levrat-Verny M-A, Leenhardt F, Leuillet M, Demigné C, Rémésy C. 2002. The Bioavailability of Ferulic Acid Is Governed Primarily by the Food Matrix Rather than Its Metabolism in Intestine and Liver in Rats. *The Journal of Nutrition* **132**:1962–1968.
- Alegría A, Garcia-Llatas G, Cilla A. 2015. Static Digestion Models: General Introduction. Pages 3–12 in K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka, and H. Wichers, editors. *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*. Springer International Publishing, Cham. Available from https://link.springer.com/10.1007/978-3-319-16104-4_1.
- Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, Tap J, Bruls T, Batto JM, et al. 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **473**:174–180.
- Aura A-M, O’Leary KA, Williamson G, Ojala M, Bailey M, Puupponen-Pimiä R, Nuutila AM, Oksman-Caldentey K-M, Poutanen K. 2002. Quercetin Derivatives Are Deconjugated and Converted to Hydroxyphenylacetic Acids but Not Methylated by Human Fecal Flora in Vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**:1725–1730. American Chemical Society.
- Balasundram N, Sundram K, Samman S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* **99**:191–203.
- Barberousse H, Roiseux O, Robert C, Paquot M, Deroanne C, Blecker C. 2008. Analytical methodologies for quantification of ferulic acid and its oligomers. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **88**:1494–1511.
- Bass LM, Wershil BK. 2015. Anatomy, Histology, Embryology, and Developmental Anomalies of the Small and Large Intestine. *Sleisenger and Fordtran’s Gastrointestinal and Liver Disease: Pathophysiology, Diagnosis, Management*. Elsevier **98**:1649–1678.
- Berner AZ, Fuentes S, Dostal A, Payne AN, Gutierrez PV, Chassard C, Grattepanche F, Vos WM de, Lacroix C. 2013. Novel Polyfermentor Intestinal Model (PolyFermS) for Controlled Ecological Studies: Validation and Effect of pH. *PLOS ONE* **8**:e77772. Public Library of Science.
- Biagi E et al. 2010. Through Ageing, and Beyond: Gut Microbiota and Inflammatory Status in Seniors and Centenarians. *PLOS ONE* **5**:e10667. Public Library of Science.

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.

Caspary WF. 1992. Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. *The American Journal of Clinical Nutrition* **55**:299S-308S. Oxford Academic.

Cerdá B, Tomás-Barberán FA, Espín JC. 2005. Metabolism of Antioxidant and Chemopreventive Ellagitannins from Strawberries, Raspberries, Walnuts, and Oak-Aged Wine in Humans: Identification of Biomarkers and Individual Variability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**:227–235.

Cinquin C, Le Blay G, Fliss I, Lacroix C. 2004. Immobilization of Infant Fecal Microbiota and Utilization in an *in vitro* Colonic Fermentation Model. *Microbial Ecology* **48**:128–138.

Cole LA, Kramer PR. 2015. *Human Physiology, Biochemistry and Basic Medicine*. Elsevier Science & Technology.

Couteau D, McCartney AL, Gibson GR, Williamson G, Faulds CB. 2001. Isolation and characterization of human colonic bacteria able to hydrolyse chlorogenic acid. *Journal of Applied Microbiology* **90**:873–881.

De Paula R, Rabalski I, Messia MC, Abdel-Aal E-SM, Marconi E. 2017. Effect of processing on phenolic acids composition and radical scavenging capacity of barley pasta. *Food Research International (Ottawa, Ont.)* **102**:136–143.

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.

Dylevský I. 2011. *Základy funkční anatomie*. Nakladatelství Václav Lukeš, Olomouc.

Eroğlu C, Avcı E, Vural H, Kurar E. 2018. Anticancer mechanism of Sinapic acid in PC-3 and LNCaP human prostate cancer cell lines. *Gene* **671**:127–134.

Ferrua MJ, Singh RP. 2015. Human Gastric Simulator (Riddet Model). Page in K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka, and H. Wichers, editors. *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*. Springer, Cham (CH). Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500155/>.

Flores GE et al. 2014. Temporal variability is a personalized feature of the human microbiome. *Genome Biology* **15**: 531.

- Fresco P, Borges F, Diniz C, Marques MPM. 2006. New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. *Medicinal Research Reviews* **26**:747–766.
- Gao S, Hu M. 2010. Bioavailability Challenges Associated with Development of Anti-Cancer Phenolics. *Mini reviews in medicinal chemistry* **10**:550–567.
- Ganong W. F. 2005. *Přehled lékařské fyziologie*, 20. vydání. Galén, Praha.
- Gelberg HB. 2014. Comparative anatomy, physiology, and mechanisms of disease production of the esophagus, stomach, and small intestine. *Toxicologic Pathology* **42**:54–66.
- Gibson GR, Cummings JH, Macfarlane GT. 1988. Use of a three-stage continuous culture system to study the effect of mucin on dissimilatory sulfate reduction and methanogenesis by mixed populations of human gut bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **54**:2750–2755.
- Gim-Krumm M, Donoso P, Zuñiga RN, Estay H, Troncoso E. 2018. A comprehensive study of glucose transfer in the human small intestine using an in vitro intestinal digestion system (i-IDS) based on a dialysis membrane process. *Journal of Membrane Science* **564**:700–711.
- Graf E. 1992. Antioxidant potential of ferulic acid. *Free Radical Biology & Medicine* **13**:435–448.
- Granger DN, Morris JD, Kvietys PR, Granger JP. 2018. *Physiology and Pathophysiology of Digestion*. Morgan & Claypool Life Science Publishers, San Rafael, UNITED STATES. Available from <http://ebookcentral.proquest.com/lib/czup/detail.action?docID=5572219>.
- Gross G, Jacobs DM, Peters S, Possemiers S, van Duynhoven J, Vaughan EE, van de Wiele T. 2010. In Vitro Bioconversion of Polyphenols from Black Tea and Red Wine/Grape Juice by Human Intestinal Microbiota Displays Strong Interindividual Variability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**:10236–10246.
- Guarner F, Malagelada J-R. 2003. Gut flora in health and disease. *Lancet (London, England)* **361**:512–519.
- Hammerstone JF, Lazarus SA, Schmitz HH. 2000. Procyanidin content and variation in some commonly consumed foods. *The Journal of Nutrition* **130**:2086–2092.
- Hansson GC, Johansson ME. 2010. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Gut Microbes* **1**:51–54.

Hayashi H, Takahashi R, Nishi T, Sakamoto M, Benno Y. 2005. Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and recto-sigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism. *Journal of Medical Microbiology* **54**:1093–1101.

Hollister EB, Gao C, Versalovic J. 2014. Compositional and Functional Features of the Gastrointestinal Microbiome and Their Effects on Human Health. *Gastroenterology* **146**:1449–1458.

Hollister EB et al. 2015. Structure and function of the healthy pre-adolescent pediatric gut microbiome. *Microbiome* **3**:36.

Hur SJ, Lim BO, Decker EA, McClements DJ. 2011. In vitro human digestion models for food applications. *Food chemistry*. [Amsterdam]: Elsevier Science. Available from <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301901346>.

James KR, Gomes T, Elmentaite R, Kumar N, Gulliver EL, King HW, Stares MD, Bareham BR, Ferdinand JF, Petrova VN, Polański K, Forster SC, Jarvis LB, Suchanek O, Howlett S, James LK, Jones JL, Meyer KB, Clatworthy MR, Saeb-Parsy K, Lawley TD, Teichmann SA. 2020. Distinct microbial and immune niches of human colon. *Nature Immunology* **21**: 343–353.

Karmakar B, Vohra RM, Nandanwar H, Sharma P, Gupta KG, Sobti RC. 2000. Rapid degradation of ferulic acid via 4-vinylguaiacol and vanillin by a newly isolated strain of *Bacillus coagulans*. *Journal of Biotechnology* **80**:195–202.

Kaur J, Katopo L, Hung A, Ashton J, Kasapis S. 2018. Combined spectroscopic, molecular docking and quantum mechanics study of β -casein and p-coumaric acid interactions following thermal treatment. *Food Chemistry* **252**:163–170.

Kumar N, Pruthi V. 2014. Potential applications of ferulic acid from natural sources. *Biotechnology Reports (Amsterdam, Netherlands)* **4**:86–93.

Kumar Singh A, Cabral C, Kumar R, Ganguly R, Kumar Rana H, Gupta A, Rosaria Lauro M, Carbone C, Reis F, Pandey AK. 2019. Beneficial Effects of Dietary Polyphenols on Gut Microbiota and Strategies to Improve Delivery Efficiency. *Nutrients* **11**. Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6770155/>.

Lafay S, Morand C, Manach C, Besson C, Scalbert A. 2006. Absorption and metabolism of caffeic acid and chlorogenic acid in the small intestine of rats. *The British Journal of Nutrition* **96**:39–46.

Liao D-H, Zhao J-B, Gregersen H. 2009. Gastrointestinal tract modelling in health and disease. *World Journal of Gastroenterology* : WJG **15**:169–176.

- Liu Z et al. 2019. Ferulic acid increases intestinal *Lactobacillus* and improves cardiac function in TAC mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **120**:109482.
- Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C. 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition* **81**:230-242.
- Marieb EN, Wilhelm PB, Mallatt J. 2017. *Human anatomy*, 8th Edition. Pearson.
- Mateo Anson N, van den Berg R, Havenaar R, Bast A, Haenen GRMM. 2009. Bioavailability of ferulic acid is determined by its bioaccessibility. *Journal of Cereal Science* **49**:296–300.
- Mathew S, Abraham T. 2006. Bioconversions of Ferulic Acid, an Hydroxycinnamic Acid. *Critical reviews in microbiology* **32**:115–25.
- Minalyan A, Gabrielyan L, Scott D, Jacobs J, Pisegna JR. 2017. The Gastric and Intestinal Microbiome: Role of Proton Pump Inhibitors. *Current gastroenterology reports* **19**:42.
- Minekus M. 2015. The TNO Gastro-Intestinal Model (TIM). Pages 37–46 in K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka, and H. Wichers, editors. *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*. Springer International Publishing, Cham. Available from https://link.springer.com/10.1007/978-3-319-16104-4_5.
- Modi SR, Collins JJ, Relman DA. 2014. Antibiotics and the gut microbiota. *The Journal of Clinical Investigation* **124**:4212–4218. American Society for Clinical Investigation.
- Mourek J. 2012. *Fyziologie*, 2. vydání. Grada, Praha.
- Nankar R, Prabhakar PK, Doble M. 2017. Hybrid drug combination: Combination of ferulic acid and metformin as anti-diabetic therapy. *Phytomedicine* **37**:10–13.
- Newton DF, Macfarlane S, Macfarlane GT. 2013. Effects of Antibiotics on Bacterial Species Composition and Metabolic Activities in Chemostats Containing Defined Populations of Human Gut Microorganisms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **57**:2016–2025.
- Nibali L, Henderson B. 2016. *The Human Microbiota and Chronic Disease: Dysbiosis As a Cause of Human Pathology*. John Wiley & Sons, Incorporated, Hoboken, UNITED STATES. Available from <http://ebookcentral.proquest.com/lib/czup/detail.action?docID=4631572>.
- Nissen L, Casciano F, Gianotti A. 2020. Intestinal fermentation in vitro models to study food-induced gut microbiota shift: an updated review. *FEMS microbiology letters* **367**.

Ou S, Kwok K-C. 2004. Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **84**:1261–1269.

Paiva LB de, Goldbeck R, Santos WD dos, Squina FM. 2013. Ferulic acid and derivatives: molecules with potential application in the pharmaceutical field. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* **49**:395–411.

Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. 2007. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS biology* **5**:e177.

Panda S, Khader IE, Casellas F, Vivancos JL, Cors MG, Santiago A, Cuenca S, Guarner F, Manichanh C. 2014. Short-Term Effect of Antibiotics on Human Gut Microbiota. *PLOS ONE* **9**:e95476. Public Library of Science.

Pathak S, Kesavan P, Banerjee A, Banerjee A, Celep GS, Bissi L, Marotta F. 2018. Chapter 25 - Metabolism of Dietary Polyphenols by Human Gut Microbiota and Their Health Benefits. Pages 347–359 in R. R. Watson, V. R. Preedy, and S. Zibadi, editors. *Polyphenols: Mechanisms of Action in Human Health and Disease (Second Edition)*. Academic Press. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128130063000258>.

Patterson E, Ryan PM, Cryan JF, Dinan TG, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. 2016. Gut microbiota, obesity and diabetes. *Postgraduate Medical Journal* **92**:286–300.

Payne A, Zihler A, Chassard C, Lacroix C. 2011. Advances and perspectives in in vitro human gut fermentation modeling. *Trends in biotechnology* **30**:17–25.

Pham VT, Mohajeri MH. 2018. The application of *in vitro* human intestinal models on the screening and development of pre- and probiotics. *Beneficial Microbes* **9**:725–742.

Poquet L, Clifford MN, Williamson G. 2008. Transport and Metabolism of Ferulic Acid through the Colonic Epithelium. *Drug Metabolism and Disposition* **36**:190–197. American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics.

Rechner AR, Spencer JPE, Kuhnle G, Hahn U, Rice-Evans CA. 2001. Novel biomarkers of the metabolism of caffeic acid derivatives in vivo. *Free Radical Biology and Medicine* **30**:1213–1222.

Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Miggiano GAD, Gasbarrini A, Mele MC. 2019. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms* **7**. <https://www.mdpi.com/2076-2607/7/1/14>.

- Roca-Saavedra P, Mendez-Vilabrille V, Miranda JM, Nebot C, Cardelle-Cobas A, Franco CM, Cepeda A. 2018. Food additives, contaminants and other minor components: effects on human gut microbiota-a review. *Journal of Physiology and Biochemistry* **74**:69–83.
- Robbins RJ. 2003. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**:2866–2887. American Chemical Society.
- Sánchez-Patán F, Monagas M, Moreno-Arribas MV, Bartolomé B. 2011. Determination of Microbial Phenolic Acids in Human Faeces by UPLC-ESI-TQ MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**:2241–2247. American Chemical Society.
- Scalbert A, Williamson G. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of Nutrition* **130**:2073–2085.
- Seliger V, Vinařický R, Trefný Z. 1983. *Fyziologie člověka: pro fakulty tělesné výchovy a sportu*, 1. vydání. Státní pedagogické nakladatelství, Praha.
- Shahidi F, Naczki M. 2004. *Phenolics in food and Nutraceuticals*. CRC Press, Florida.
- Shahidi F, Wanasundara PK. 1992. Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **32**:67–103.
- Silbernagl S, Despopoulos A. 2004. *Atlas fyziologie člověka*, 6. vydání. Grada, Praha.
- Song H et al. 2020. Phenolic acid profiles of common food and estimated natural intake with different structures and forms in five regions of China. *Food Chemistry* **321**:126675.
- Srinivasan M, Sudheer AR, Menon VP. 2007. Ferulic Acid: Therapeutic Potential Through Its Antioxidant Property. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* **40**:92–100.
- Stevens JF, Maier CS. 2016. The Chemistry of Gut Microbial Metabolism of Polyphenols. *Phytochemistry reviews : proceedings of the Phytochemical Society of Europe* **15**:425–444.
- Thuenemann EC, Mandalari G, Rich GT, Faulks RM. 2015. Dynamic Gastric Model (DGM). Pages 47–59 in K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka, and H. Wichers, editors. *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*. Springer International Publishing, Cham. Available from https://link.springer.com/10.1007/978-3-319-16104-4_6.
- Trojan S, Schreiber M. 2002. *Atlas biologie člověka: 430 modelových otázek k přijímacím zkouškám na medicínu: 100 obrazových podkladů k opakování a procvičování*. Scientia, Praha.
- Tsao R. 2010. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients* **2**:1231–1246.

Van de Wiele T, Van den Abbeele P, Ossieur W, Possemiers S, Marzorati M. 2015. The Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME®). Pages 305–317 in K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka, and H. Wichers, editors. *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*. Springer International Publishing, Cham. Available from https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-319-16104-4_27.

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 & Function* **6**:2424–2439.

Velíšek J. 2002. *Chemie potravin*, 3. díl. Osis, Tábor.

Velíšek J, Hajšlová J. 2009. *Chemie potravin II*. Osis, Tábor.

Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, Requena T, Swiatecka D, Wichers H. 2015. In Vitro Fermentation Models: General Introduction. Page The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models. Springer. Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500158/>.

Walker WA, Iyengar RS. 2015. Breast milk, microbiota, and intestinal immune homeostasis. *Pediatric Research* **77**:220–228. Nature Publishing Group.

Wunderli J. 1973. *Biologie člověka*. Avicenum, Praha.

Zduńska K, Dana A, Kolodziejczak A, Rotsztejn H. 2018. Antioxidant Properties of Ferulic Acid and Its Possible Application. *Skin Pharmacology and Physiology* **31**:332–336.

Zhao Z, Moghadasian MH. 2008. Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. *Food Chemistry* **109**:691–702.

Žilić S, Šukalović V, Dodig D, Maksimović V, Maksimovic M, Basić Z. 2011. Antioxidant activity of small grain cereals caused by phenolics and lipid soluble antioxidants. *Journal of Cereal Science* **54**:417–424.

9 Seznam obrázků a tabulek

Seznam obrázků:

Obrázek č. 1: Vzorec kyseliny hydroxykořicové

Obrázek č. 2: Vzorec kyseliny ferulové

Obrázek č. 3: Trávicí trakt člověka

https://cs.wikipedia.org/wiki/Trávicí_soustava_člověka

Obrázek č. 4: Tlusté střevo

<https://www.medimerck.cz/cz/home/oncology/colon-cancer.html>

Obrázek č. 5: Zastoupení mikroorganismů v jednotlivých částech zažívacího traktu

(upraveno a převzato z Gorkiewicz & Moschen 2018)

Gorkiewicz G, Moschen A. 2018. Gut microbiome: a new player in gastrointestinal disease. *Virchows Archiv* **472**:159–172.

Obrázek č. 6: Rozdělení nejčastěji se vyskytujících kmenů střevní mikrobioty, kmenů *Firmicutes* a *Bacteroidetes* (převzato a upraveno z Rinninella et al. 2019)

Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Miggiano GAD, Gasbarrini A, Mele MC. 2019. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms* **7**. <https://www.mdpi.com/2076-2607/7/1/14>.

Obrázek č. 7: Syntéza kyseliny ferulové a příbuzných sloučenin v rostlinách (převzato a upraveno z Zhao & Moghadasian 2008)

Zhao Z, Moghadasian MH. 2008. Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. *Food Chemistry* **109**:691–702.

Obrázek č. 8: Metabolické dráhy kyseliny ferulové

Zhao Z, Moghadasian MH. 2008. Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. *Food Chemistry* **109**:691–702.

Obrázek č. 9: Graf závislosti koncentrace kyseliny ferulové a jejích metabolitů na čase mezi věkovými skupinami v ošetřené variantě, N=20

Obrázek č. 10: Strukturní vzorce jednotlivých metabolitů kyseliny ferulové; A: kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová; B: kyselina 3-hydroxyfenyloctová; C: kyselina hydroferulová; D: kyselina 3,4-dihydroxyhydroxykořicová; E: kyselina 3-(3-hydroxyfenyl)propionová; F: kyselina 3-fenylpropionová

Obrázek č. 11: Graf závislosti koncentrace kyseliny ferulové a jejích metabolitů na čase v ošetřené variantě a v kontrole, N=20; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Obrázek č. 12: Graf závislosti kyseliny ferulové na čase mezi věkovými skupinami A a B v ošetřené variantě, N=20; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Obrázek č. 13: Graf závislosti koncentrace kyseliny ferulové na čase podle jednotlivých dárců z věkové skupiny A a B, N=20

Obrázek č. 14: Graf závislosti koncentrace kyseliny hydroferulové na čase podle jednotlivých dárců z věkové skupiny A a B, N=20

Obrázek č. 15: Graf závislosti koncentrace kyseliny 3-fenylpropionové na čase podle jednotlivých dárců z věkové skupiny A a B, N=20

Obrázek č. 16: Graf závislosti koncentrace kyseliny 3-(3-hydroxyfenyl)propionové na čase podle jednotlivých dárců z věkové skupiny A a B, N=20

Obrázek č. 17: Graf závislosti koncentrace kyseliny 3,4-dihydroxyskořicové na čase podle jednotlivých dárců z věkové skupiny A a B, N=20

Seznam tabulek:

Tabulka č. 1: Výskyt kyseliny ferulové (převzato a upraveno z Kumar & Pruthi 2014)