

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality a bezpečnosti potravin



**Transport biologicky aktivních stilbenoidů a jejich derivátů v in vitro modelu střevní
sliznice**

Diplomová práce

Bc. Kateřina Kutlvašrová

Výživa a potraviny

Mgr. Petr Maršík, Ph.D.

©2021 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci transport biologicky aktivních stilbenoidů a jejich derivátů v in vitro modelu střevní sliznice jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 26.4.2021

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Mgr. Petru Maršíkovi, Ph.D. za vedení práce a cenné rady v oblasti vyhodnocování vzorků v LC/MS, konzultantovi doc. Ing. Jaroslavu Havlíkovi, Ph.D. a v neposlední řadě Ing. Ondřeji Veselému za veškerý věnovaný čas a především trpělivost. Dále bych ráda poděkovala své rodině za podporu při studiu a dále kamarádce Ing. Anetě Pivoňkové za pomoc s překladem souhrnu.

Transport biologicky aktivních stilbenoidů a jejich derivátů v in vitro modelu střevní sliznice

Souhrn

Stilbenoidy jsou sekundární metabolity mnoha rostlinných druhů. Slouží především jako ochranný faktor proti mnohým stresorům, jako jsou například škůdci, plísňe či nepříznivé vnější podmínky. Jsou součástí rostlinné složky stravy lidí již od pradávna. Nachází se v nadzemních i podzemních částech rostlin, z nichž mezi nejčastěji uváděnými jsou bobule vinné révy, plody moruše a mnoho dalších. Mezi nejvýznamější a současně nejznámější zástupce lze zařadit resveratrol, který se dostal do povědomí veřejnosti díky tzv. „francouzskému paradoxu“.

Tato práce měla za cíl sledovat osud stilbenoidů a jejich derivátů v prostředí střevní sliznice. Úkolem bylo popsat biodynamické procesy probíhající na úrovni střevní sliznice při konzumaci stilbenoidů, a to pomocí LC/MS s ultravysokým rozlišením.

Pokusem bylo zjištěno, že afinita prenylovaných stilbenoidů ke střevním buňkám je natolik silná, že prenyly dále pravděpodobně nepřechází do krevního řečiště. Tuto skutečnost však nelze zcela vyvrátit, protože je možné, že sloučeniny tvoří různé komplexy s látkami nezahrnutými do naší studie (proteiny a další biologické makromolekuly) a aktivita těchto komplexů se také může v biologických procesech uplatňovat. Pro některé testované látky však byly nalezeny námi předpokládané glukoronidové nebo hydroxylové konjugáty, které mohou mít specifickou biologickou aktivitu odlišnou od původních molekul..

Hypotéza, že se prenylované stilbenoidy dostávají do krevního řečiště je naším pokusem částečně vyvrácena, avšak jejich potenciál při kumulaci uvnitř buněk střevního epitelu je stále nedozrnlý. Depotní intracelulární zásoby vykazují v některých studiích větší důležitost než přítomnost v krevním řečišti.

Klíčová slova: stilbeny, permeabilita, metabolismus, LC/MS, Q-TOF

Transport of biologically active stilbenoids and their derivatives in intestinal epithelium model in vitro

Summary

Stilbenoids are considered to be the secondary metabolites of many plant species. Their primary function includes protection against many stressors, such as pests, mould or adverse external conditions. Moreover, they are an important part of the plant component of human food. They are located in both the above-ground and underground parts of plants among which the most frequently mentioned are vine berries, mulberry fruits etc. Resveratrol is the most significant and the best-known representative that became known to the public due to the “French paradox”.

This work aimed to monitor the fate of stilbenoids and their derivatives in the intestinal mucosa. The task was to describe the biodynamic processes taking part at the intestinal mucosa's level during the consumption of stilbenoids, using ultra-high-resolution LC / MS.

The experiment discovered that the affinity of prenylated stilbenoids to intestinal cells is so strong that prenyls no longer pass into the bloodstream. This fact cannot be completely refuted, because it is possible that the compounds form complexes with substances not included in our study (proteins and other biological macromolecules) and the activity of these complexes may also be included in biological processes. However glucuronide or hydroxyl conjugates were found in a few samples, which may have a specific biological activity different from the original molecules.

However, glucuronide or hydroxyl conjugates were found in a few samples. The hypothesis of getting prenylated stilbenoids into the bloodstream is disproved by our experiment. Nevertheless, the potential of prenylated stilbenoids for accumulation within intestinal epithelial cells is still unimaginable. In some studies, depot intracellular stores are more important than their presence in the bloodstream.

Keywords: stilbenes, permeability assay, metabolism, LC/MS, Q-TOF

Obsah

1 Úvod	9
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	10
3 Literární rešerše	11
3.1 Stilbenoidy	11
3.1.1 Chemické vlastnosti	11
3.1.2 Resveratrol.....	11
3.1.3 Dihydroresveratrol.....	13
3.1.4 Oxyresveratrol	13
3.1.5 Prenylované stilbenoidy	14
3.2 Lidské střevo	15
3.2.1 Střevní homeostáza	16
3.2.2 Zánět a onemocnění střev	16
3.3 Lidské Caco 2 buňky	16
3.4 Metabolismus stilbenoidů	17
3.5 Metabolomika	17
3.5.1 Softwarové nástroje v metabolomice	18
3.6 Kapalinová chromatografie	19
3.6.1 HPLC.....	19
3.6.2 UHPLC	19
3.7 Hmotnostní spektrometrie	19
3.7.1 Kvadrupólové analyzátory	19
3.7.2 Analyzátor doby letu (TOF).....	20
3.7.2.1 Q-TOF.....	20
4 Metodika	21
4.1 Materiál	21
4.1.1 Použité vzorky.....	21
4.1.2 Interní standard	21
4.1.3 Chemikálie	21
4.2 Instrumentální část	21
4.2.1 Laboratorní zařízení	21
4.2.2 UHPLC	22
4.2.3 Q-TOF	22
4.3 Metoda	22
4.3.1 Test propustnosti.....	22
4.3.2 Měření integrity monovrstvy.....	23

4.3.3	Extrakční metoda pro získání vzorků	23
4.3.4	Podmínky analýzy	23
4.4	Vyhodnocování dat	24
4.4.1	Seznam testovaných stilbenoidů	24
4.5	Kalibrační křivky	26
5	Výsledky	26
5.1	Data Analysis 4.3.	26
5.2	Průběh metabolismu prenylovaných stilbenoidů a monitoring jejich transportu ..	27
5.2.1	N-MS-30-F2	28
5.2.2	N-MS-13-F5	28
5.2.3	N-MS-27-B4.....	29
5.2.4	N-MS-70-B1.....	30
5.2.5	N-MS-22-B2.....	30
5.3	Tvorba metabolitů.....	31
5.3.1	Výskyt hydroxylovaných metabolitů vybraných prenylovaných stilbenoidů.....	31
5.3.2	Výskyt glukuronidových metabolitů vybraných stilbenoidů	31
5.4	Interference	32
5.5	XCMS Online	32
7	Diskuze	35
8	Závěr	37
9	Literatura.....	38
10	Seznam použitých zkratk a symbolů.....	43
11	Seznam obrázků a tabulek.....	I
12	Seznam příloh	II
12.1	Grafické znázornění kalibračních křivek vybraných sloučenin prenylovaných stilbenoidů	II
12.2	Tabulky znázorňující významné hmoty nalezené v XCMS při porovnání mezi vybranými skupinami	II

1 Úvod

Stilbeny jsou sekundární metabolity mnoha rostlin napříč celou rostlinnou říší. Rostlinám slouží k ochraně před škůdci a nepříznivými vnějšími podmínkami. Jsou součástí mnoha rostlin, které jsou denně konzumovány lidmi a díky vědeckým studiím bylo objeveno jejich antioxidační působení *in vitro* ale také *in vivo*.

Z celosvětových statistik vyplývá, že nejčastější příčinou úmrtí jsou v současné době kardiovaskulární a nádorová onemocnění. Tento vývoj se připisuje zejména nesprávnému životnímu stylu, který zahrnuje konzumaci ultrazpracovaných potravin a nedostatek fyzické aktivity.

Největší pozornosti bylo věnováno stilbenoidům, konkrétně pak resveratrolu, v souvislosti s objevem tzv. „francouzského paradoxu“. Francouzským paradoxem byl označován jev, kdy francouzi měli poměrně nízkou incidenci kardiovaskulárních onemocnění, přestože konzumovali velmi tučnou stravu. Paradox byl vysvětlován tak, že resveratrol obsažený ve víně eliminuje negativní účinky tučné stravy. Postupem času se však ukázalo, že koncentrace resveratrolu, které by odpovídaly zmíněným účinkům jsou natolik vysoké, že není možné je do lidského těla dostat běžnou konzumací vína.

Resveratrol má 2 konfigurační formy, a sice *cis* a *trans*. Mnohem více studií je věnováno právě transresveratrolu, který je v přírodě častěji zastoupen zejména díky své chemické stabilitě. Cis-resvetrol vzniká při expozici trans-resveratrolu UV zářením.

V lidském těle však dochází k metabolismu stilbenoidů, který vede ke tvorbě konjugátů, které značně snižují jejich biologickou dostupnost. Další otázkou je také metabolismus stilbenoidů střevní mikrobiotou.

Tato diplomová práce se pomocí LC/MS s ultravysokým rozlišením pokouší monitorovat transport a případné metabolické změny bioaktivních stilbenoidů přes střevní sliznici simulovanou monovrstvou Caco-2 buněk *in vitro*.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Polyfenoly jsou z hlediska zdravotních benefitů intenzivně sledovanou skupinou složek potravin. V rámci nich jsou patřící stilbenoidy a jejich deriváty k látkám, jejichž zdravotní potenciál je v poslední době zkoumán jak z hlediska jejich přímých biologických účinků, tak i jejich příjmu a transportu v rámci organismu.

Cílem práce je sledovat metabolický osud bioaktivních polyfenolických stilbenoidů a jejich přírodních derivátů s biologickou aktivitou při transportu buňkami střevní sliznice a popsat dynamiku tohoto procesu pomocí analýzy prostřednictvím LC/MS s ultravysokým rozlišením a vysokou přesností určení molekulové hmotnosti.

Hypotéza 1: Stilbenoidy a jejich deriváty jsou polarizovaně transportovány buňkami střevní sliznice směrem z lumen do krevního oběhu.

Hypotéza 2: Při tomto transportu dochází k cíleným chemickým změnám molekul přenášených stilbenoidů.

3 Literární rešerše

3.1 Stilbenoidy

Stilbenoidy jsou třídou sloučenin s mnoha farmaceuticky významnými vlastnostmi. Patří mezi fytoalexiny, které se nacházejí ve vysokých koncentracích v bobulích hroznů, ořechách a čajích. V rostlinách je jejich hlavní funkcí ochrana rostlin před patogeny a houbami. Jejich obsah je tedy velmi variabilní a zvyšuje se s vystavením stresu. Ke zvýšení koncentrace v hroznech dochází při vystavení UV záření, expozici těžkými kovy nebo napadení plísňovou infekcí. (Pitrowska et al. 2012)

Rostliny obsahující stilbenoidy se hojně používají v lidovém léčení k léčbě žaludeční bolesti, hepatitidy, artritidy, infekcí močových cest, plísňových onemocnění nebo k zánětům kůže. Navíc mají stilbenoidy kardioprotektivní, antikarcinogenní, antivirové, neuroprotektivní a další vlastnosti, a to díky své protizánětlivé a antioxidační povaze (Ishihata et al. 2016).

3.1.1 Chemické vlastnosti

Stilbenoidy jsou dusíkaté polyfenoly kyselého a amfifilního charakteru. Jejich amfifilní charakter zapříčiňuje, že jsou součástí mnohých biomembrán (Neves et al. 2012).

Strukturálně mají stilbenoidy dva aromatické kruhy spojené ethylenovým nebo ethenovým můstkem s různými substituenty. I když přítomnost dvojné vazby naznačuje, že stilbenoidy existují v cis- i trans-formě, trans-forma je stabilnější a biologicky významnější formou. V přírodě se stilbenoidy syntetizují z fenylalaninu prostřednictvím řady enzymatických reakcí (Poulose et al. 2015). Stilbenoidy jsou heterogenně rozmístěny po celém rostlinné říši. Obzvláště se vyskytují v rodech *Gnetaceae*, *Pinaceae*, *Cyperaceae*, *Fabaceae*, *Dipterocarpaceae* a *Vitaceae* (Riviere et al. 2012). Monomerní stilbenoidy byly v posledních letech mnohem více prostudovány než oligomerní stilbenoidy. Souvisí to zejména s jejich masivnějším výskytem v přírodě a také jednoduchou strukturou, která je pro identifikaci snadnější než jejich strukturální modifikace.

3.1.2 Resveratrol

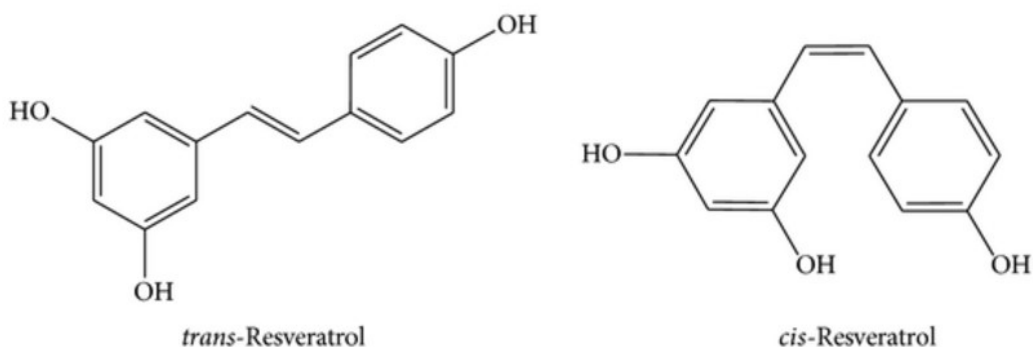
Resveratrol (3, 4, 5-trihydroxystilben) se nachází zejména v červeném víně, hroznech a bobulích. Koncentrace resveratrolu v červených vínech kolísá mezi 0,1 mg až 15 mg / l (Frémont, 2000).

V současné době jsou primárním zdrojem resveratrolu kořeny vytrvalé rostliny *Polygonum cuspidatum* (japonský uzlíček) (Pitrowska et al. 2012). Díky studiím ohledně tzv. „francouzského paradoxu“ byla biologická aktivita resveratrolu rozsáhle studována. Většina biologických účinků je přisuzována stabilnější isoformě trans-resveratrolu. Nicméně u cis-resveratrolu, který vzniká expozicí trans-resveratrolu UV zářením, byla prokázána také určitá protizánětlivá aktivita. Trans-resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxystilbene, t-RES) můžeme nalézt především v arašidech, hroznech, červeném víně atd. Vasorelaxantivní účinky vykazuje pomocí inhibice trombomanu A2 syntetázy a dalšími mechanismy (Radko et al. 2013).

Ukázalo se, že protizánětlivá aktivita resveratrolu je spojena s jeho schopností inhibovat aktivitu COX-1 a COX-2 (Zykova et. al.2008).

Bylo také prokázáno, že resveratrol inhibuje aktivitu transkripčních faktorů NF-kB a AP-1, z nichž oba přímo regulují aktivitu cyklooxygenáz i indukovatelnou syntázu oxidu dusnatého. Tyto dva faktory se podílejí především na imunitní odpovědi organismu (Szaefer et al. 2014).

Vysoká biologická aktivita, ale nízká biologická dostupnost resveratrolu se často označuje jako „resveratrol paradox“, což má několik možných vysvětlení. V nedávných studiích byla zjištěna zásadní úloha intracelulární zásoby resveratrolu, která může být důležitější než hladina v krevním séru. Studie na myších a obézních lidech ukázaly významný biologický účinek resveratrolu již při nízkých plazmatických koncentracích, a sice 10-120 ng/ml a 231 ng/ml. Tyto studie navíc ukázaly, že podávání resveratrolu zvýšilo funkci mitochondrií za pomoci aktivace SIRT1 a PGC-1 α , což mělo za výsledek zvýšení anaerobní kapacity, zlepšení senzomotorických funkcí a zvýšení bdělosti u lidí. Konjugáty navíc zlepšují rozpustnost metabolitů ve vodě, a tak jsou snadno vyloučeny za pomoci moči, a to zejména u sulfátových a glukuronidových konjugátů (Chen et al. 2013) K dosažení uvedených plazmatických koncentrací resveratrolu ale není téměř možné dojít konzumací běžných potravin. Ukazuje se, že perorální dávka o hmotnosti 25 mg je 0,5 – 2h po konzumaci detekována v krevní plazmě v koncentracích nižších než je 10 ng/ml. Přičemž odhady se pohybovaly okolo 400-500 ng/ml. Tato skutečnost ukazuje na velmi nízkou perorální dostupnost (Goldberg et al. 2003).



Obrázek 1: molekula *trans*-resveratrolu a *cis*-resveratrolu

Tabulka 1: obsah resveratrolu ve vybraných potravinách

Potravina	Obsah resveratrolu
Arašídý	0,01 - 0,07 $\mu\text{g/g}$
Arašídové máslo	0,02 - 0,98 $\mu\text{g/g}$
Křídlatka japonská (<i>Polygonum cuspidatum</i>)	296 – 377 $\mu\text{g/g}$
Zelené hrozny	0,02 – 0,32 $\mu\text{g/g}$
Tmavé hrozny	0,95 – 1,88 $\mu\text{g/g}$
Červené víno	1,98 – 7,13 $\mu\text{g/g}$
Bílé víno	0,05 – 1,80 $\mu\text{g/g}$

(Charu et al. 2014)

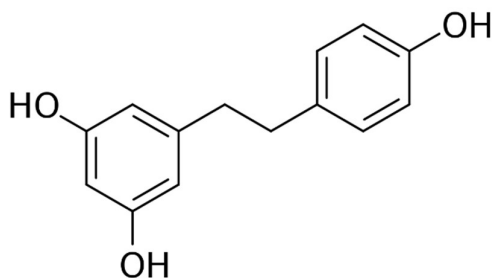
3.1.3 Dihydroresveratrol

Dihydrostilbenoidy, různorodá třída přírodních produktů, které se liší od stilbenoidů chybějící dvojitou vazbou v etylénovém řetězci spojující aromatické kruhy. Můžeme je nalézt v houbách, mechu, kapradinách a kvetoucích rostlinách.

Dihydroresveratrol je přirozeně se vyskytující sloučenina v červeném víně. Má relativně nízkou molekulovou hmotnost a jeho chemická struktura se vzdáleně podobá 17 β -estradiolu a diethylstilbestrolu. Ve studiích bylo zjištěno, že má neobvykle silný proliferační účinek v některých nádorových buňkách, které jsou ovlivněny hormonálně (Murata et al. 2004).

Významný efekt byl pozorován již v pikomolární koncentracích právě na buňkách MCF7, které se vyskytují u karcinomu prsu (Mueller et al. 2004). Zároveň se však ukazuje, že účinky nebyly pozorovány v buněčných liniích, kterým schází estrogenové receptory. Z toho vyplývá, že pokud bude pacientovi podán lék, který působí antagonisticky proti estrogenu, účinek dihydroresveratrolu se tím zvrátí (Gakh et al. 2010).

Proliferační účinky byly dále prokázány i u nádorových buněk přítomných při rakovině prostaty. Přesný mechanismus účinku zatím není známý, ale je předpoklad, že dihydroresveratrol aktivuje modulaci hormonálních receptorů. (Anisimova et al. 2011).



Obrázek 2: molekula dihydroresveratrolu

3.1.4 Oxyresveratrol

Oxyresveratrol je m-hydroxy derivát resveratrolu. Nejčastěji se získává z *Artocarpus lacucha*, což je rostlina známá pro své antiparazitální účinky (Maneechai et al. 2009). Jeho protizánětlivá aktivita je však obecně nižší než u resveratrolu. Je též známým inhibitorem COX-1. Inhibice vůči COX-2 a 5-LOX je ale zhruba pětina v porovnání s resveratrole. Obdobně nízkou aktivitu vykazuje také proti NF-B. Žádný účinek je neprojevil proti aktivitě IKK a fosforylaci IB. Tyto nižší aktivity jsou přisuzovány tomu, že nedokáže tvořit polochinonový radikál (Dvorakova et al. 2019).

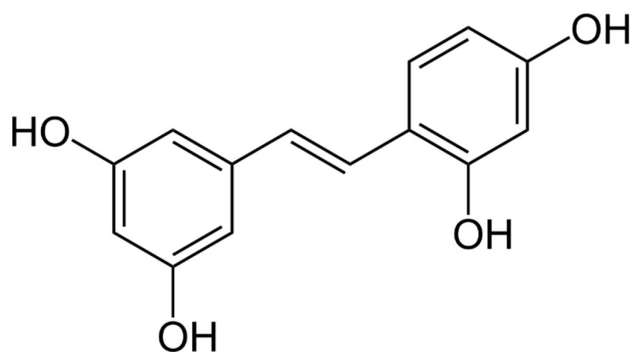
Při pokusech in vitro, a to konkrétně na *Artocarpus lakoocha* z čeledi Moraceae, bylo zjištěno, že oxyresveratrol produkoval ROS a zároveň zredukoval měďnaté ionty na mědné.

Tato skutečnost nám napovídá o jeho prooxidační aktivitě, která může být spojována se schopností působit jako protirakovinová sloučenina (Radapong et al. 2020).

Dále se ukazuje, že oxyresveratrol vykazuje silné neuroprotektivní účinky in vivo v souvislosti s cévní mozkovou příhodou. Již od dávky 10 mg/kg se ukazuje významná neuroprotektce, avšak při dávce 20 mg/kg je neuroprotektce optimální. K pozorování neuroprotektivních účinků oxyresveratrolu bylo použito zachycení aktivity ROS a RNS, ale není zřejmé, zda nedošlo ještě k dalším mechanismům. Z histologických a neologických vyšetření je zřejmé, že došlo k zmenšení objemu mozkové příhody a celkovému snížení následků z hlediska oslabení neurologických funkcí. Tato zjištění vypovídají o menším zásahu do kvality následného života pacienta po prodělané mozkové příhodě (Andrabi et al. 2004).

Neuroprotektivní účinky oxyresveratrolu byly dále prokázány u neurodegenerativních onemocnění, jako jsou Alzheimerova či Parkinsonova choroba (Chao et al. 2008).

Junsaeng et al. (2019) navíc ve své studii představili významný způsob, kterým se zvýšila biologická dostupnost oxyresveratrolu při perorálním i intravenózním podání. Současně s oxyresveratrolem byl podáván potkanům piperin. Ze studie vyplývá, že biologická dostupnost oxyresveratrolu se zvýšila dvojnásobně.



Obrázek 3: molekula oxyresveratrolu

3.1.5 Prenylované stilbenoidy

Prenylace je proces, při kterém dochází k navázání chemického řetězce na stilbenoid.

Díky prenylaci je možné zvýšit lipofilitu molekuly a tím ovlivnit její biologickou funkci (Hoarau et al. 2003). Přínosnost tohoto procesu tkví ve zvýšení afinity vůči biologickým membránám a zlepšení interakcí s cílovými proteiny (Xu et al. 2012).

Naproti tomu, u neprenylovaných stilbenoidů často dochází při perorálním příjmu často ke konjugaci se sacharidy za vzniku glykosidů, následné deglykosidaci v tenkém střevě a prostupem aglykonů skrz stěnu tenkého střeva směrem do jater (Karabín et al. 2012).

Prenylované stilbenoidy představují skupinu potenciálních přírodních antibakteriálních látek, které vykazují slibnou aktivitu proti MRSA. Podobně jako jiné fenolové sloučeniny zvyšuje prenylace stilbenoidů jejich antibakteriální aktivitu. Prenylované stilbenoidy představují skupinu přírodních potenciálních antibakteriálních látek s aktivitou proti gram-

pozitivní bakteriím rezistentní na antibiotika. Ukazuje se obecně, že prenylace zvyšuje antimikrobiální aktivitu, avšak u prenylace aromatického kruhu vykazuje významější zvýšení antimikrobiální aktivity než prenylace řetězce (Bruijn et al. 2018).

Obecně prenylované stilbenoidy vykazují estrogení, protinádorovou, protizánětlivou a antioxidační aktivitu. Jejich farmaceutický potenciál je navíc podpořen skutečností, že nenapadají zdravé tělní buňky (Yang et al. 2015).

Celkové účinky výrazně závisí na polohách a celkovém počtu prenylovaných skupin. Bylo zjištěno, že celková cytotoxicita vůči nádorovým buňkám se zvyšuje s narůstajícím počtem prenylovaných skupin (Prausová et Kollár, 2019).

3.2 Lidské střevo

Funkce střevní bariéry úzce souvisí se zdravím a nemocemi střeva. Homeostáza je regulována mukózní vrstvou epitelových buněk, antibakteriálních peptidů a strukturou těsných spojů (Suzuki, 2013). Střevní struktury jsou organizovány pomocí několika integrálních proteinů, jako jsou transmembránové a cytosolické proteiny, které poskytují fyzickou bariéru pro vstup luminálních zánětlivých molekul, jako jsou patogeny, toxiny a potravinové antigeny (Denker et Sabath, 2011).

Některé vědecké a nedávné klinické studie ukázaly, že existuje úzká souvislost mezi defektem střevní bariéry a výskytem různých onemocnění. Defekty střevní bariéry, které vedou k průniku zánětlivých molekul, vyvolávají abnormálně robustní zánětlivé reakce, jakož je tomu i v případě zánětlivých střevních onemocnění (IBD). Vzhledem ke klíčovým rolím regulace střevní bariéry ve zdraví je věnována velká pozornost zapojení těsných spojů do terapeutických a preventivních přístupů k některým poruchám (Landy et al., 2016). Ačkoli zahájení a progresse těchto onemocnění je založena na mnoha mechanismech, nedávná zjištění naznačují, že defekt střevní bariéry a hyperpermeabilita mají roli v patogenezi těchto onemocnění. Regulace střevní bariéry proto může být jedním z mechanismů, které jsou základem zmírnění těchto onemocnění zprostředkovaného resveratolem. Předchozí studie *in vitro* ukázala, že resveratrol zmírňuje dysfunkci střevní bariéry a bakteriální translokaci indukovanou deoxynivalenolem, hlavním kontaminantem mykotoxinů v potravinách, který může vyvolat poškození střev a zánět (Ling et al. 2016).

Informace o regulaci střevní bariéry resveratolem, který byl zdrojem potravy, jsou však stále omezené. Střevní bariéra je vždy ohrožena různými stimuly, jako jsou patogeny, v zánětlivých cytokinech a reaktivními druhy kyslíku (ROS), které jsou úzce spojeny s vývojem střevní zánětlivosti. Hlavními zdroji zánětlivých cytokinů a ROS jsou aktivované imunitní buňky, jako jsou makrofágy, neutrofilů, dendritické buňky, T buňky. V IBD je běžná mukózní filtrace polymorfonukleárních neutrofilů. Neutrofilů vytvářejí převážně H_2O_2 , což vede k chronickému zánětu a poškození tkáně (Turner, 2009).

3.2.1 Střevní homeostáza

Udržování střevní homeostázy je pro lidské zdraví kriticky důležité. Funkční defekty TJ a zvýšená paracelulární permeabilita ve střevě vedou k inflaci lumenálních proin-ammatorních molekul a aktivaci slizničního imunitního systému, což vede k chronickému střevnímu zánětu (Suzuki, 2013).

Bylo prokázáno, že resveratrol, polyfenol, který se nachází v hroznech, předchází nemocím nebo snižuje nemocnost u zvířat a lidí. Mechanismy, na nichž jsou tyto účinky založeny, se však zdají komplikované a nebyly prozkoumány. Předkládané výsledky poskytují nové informace o účinku resveratrolu na podporu funkce střevní bariéry. Naznačují také schopnost resveratrolu zmírnit narušení bariéry vyvolané oxidačním činidlem H₂O₂ a prozánětlivým cytokinem IL-6 v buňkách Caco-2. Naše nálezy naznačují, že regulace střevní bariéry může být částečně zapojena do prevence a snižování zánětlivých chorob resveratrolem (Carrasco-Pozo et al., 2013).

3.2.2 Zánět a onemocnění střev

Sheth et al. (2009) prokázali, že zvýšení intestinální hyperpermeability vyvolané H₂O₂ je spojeno s tyrosinovou (Tyr) fosforylací (Alonzi et al. 1998).

V patologických stavech hraje nadměrná produkce IL-6 a aktivace signálních drah IL-6 klíčovou roli v akutním i chronickém zánětu. Předchozí studie ukázaly, že IL-6 indukuje expresi pórtvorné klaudinové izoformy claudin-2 ve střevních epiteliálních buňkách, což má za následek hyperpermeabilitu (Nakamura et al. 1992; Suzuki et al. 2011).

U pacientů s ulcerózní kolitidou a chronickými onemocněními byla abnormálně vysoká exprese klaudinu-2 při biopsii. Výše uvedená zjištění naznačují, že ochrana střevní bariéry před H₂O₂ a IL-6 může být účinným přístupem při prevenci zánětu střeva. Tato studie zkoumala možné použití resveratrolu k regulaci funkce bariéry TJ v lidských střevních Caco-2 buňkách. Buňky byly ošetřeny H₂O₂ a IL-6, které poškodily střevní bariéru, aby se prozkoumal ochranný účinek resveratrolu. Nicméně zlepšení integrity TJ bariéry bylo zkoumáno pomocí nestimulovaných buněk Caco-2 (Dong et al. 2020).

3.3 Lidské Caco 2 buňky

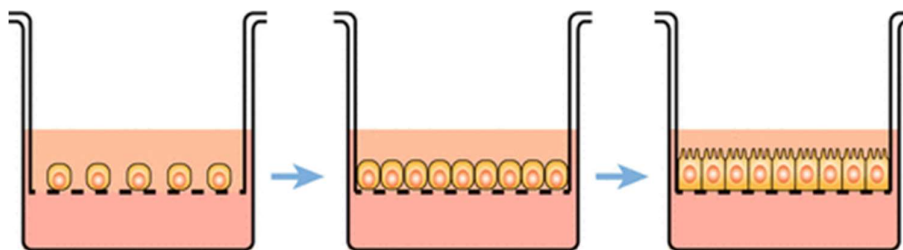
Lidská epiteliální buněčná linie Caco-2 je široce používána jako model střevní epiteliální bariéry. Buněčná linie Caco-2 je původně odvozena z kolorektálního adenokarcinomu tlustého střeva. Tento objev učinil Jorgem Fogh v ústavu pro výzkum rakoviny (Fogh et al. 1977).

Jednou z jeho nejvýhodnějších vlastností je však jeho schopnost spontánně se diferencovat na monovrstvu buněk s mnoha vlastnostmi typickými pro absorpční enterocyty, které se nachází v tenkém střevu. Buněčná linie Caco-2 je heterogenní a obsahuje buňky s mírně odlišnými vlastnostmi. Lze tedy očekávat, že podmínky kultivace jsou vhodné pro růst subpopulací buněk, což vede k systému buněčných modelů s vlastnostmi, které se mohou lišit od původní buněčné linie. Proto výsledky získané za podobných experimentálních podmínek v různých laboratořích nemusí být přímo srovnatelné. Z tohoto důvodu byla stanovena řada klonovaných buněčných linií Caco-2, které jsou popsány v literatuře. Jsou poskytnuty podrobné

protokoly pro manipulaci s buňkami Caco-2 v laboratoři. Správné testování buněčné monovrstvy je naprosto zásadní při využívání buněk Caco-2 k měření interakce, absorpce a buněčného transportu léků a potravinových složek (Lea, 2015).

Pro bližší napodobení stérických podmínek ve střevě in vivo jsou buňky Caco-2 kultivované na propustných filtračních vložkách, které lze získat od mnoha dodavatelů. Kultivace buněk Caco-2 na filtru podporuje zlepšení jejich morfologických a funkčních diferenciací. Bylo to dobře zdokumentováno, že polarizované monovrstvy Caco-2 spolehlivě kolerují s absorpcí léčiv a jiných sloučenin po perorálním příjmu u lidí (Cheng et al. 2008).

Ve srovnání s normálním střevním epitelem má Caco-2 buněčný model několik omezení. Normální střevní epitel obsahuje více než jeden buněčný typ, nejen enterocyty. Další nevýhodou Caco-2 linie je, že oproti střevnímu epitelu postrádá střevní hlen, přítomnost žlučových kyselin a fosfolipidů. Tyto faktory silně ovlivňují absorpci lipofilních látek in vivo (Lea, 2015).



Obrázek 4: růst tkáňových monovrstev

(Lea, 2015)

3.4 Metabolismus stilbenoidů

Účinnost stilbenů, které jsou podávány perorálně, závisí na jejich absorpci, metabolismu a distribuci tkáněmi. Ukazuje se, že konjugované formy jsou oproti volným formám ve vzorcích živočichů nacházeny častěji. Při výzkumech prováděných na lidech se ukázalo, že hlavním metabolitem v jaterním metabolismu je trans-resveratrol-3-O-glukoronid. U výzkumů provedených na myších a potkanech byly zjištěny trans-resveratrol-3-O-glukoronid a trans-resveratrol-3-sulfát jako významné metabolity ve vzorcích jejich moči (Yu et al. 2002).

Nejvíce studovaným, z hlediska metabolismu, je resveratrol, mnohé studie se však zaměřují i na jeho analoga a ukazuje se, že absorpce monovrstvou Caco-2 buněk probíhá na stejném principu, ovšem v jiné míře (Kim et al. 2008).

3.5 Metabolomika

Metabolomika je celková analýza metabolomu za určitého fyziologického nebo vývojového stádia organismu, tkáň nebo buňky. Snaží se o zachycení aktivních procesů uvnitř buňky, které jsou velmi rychlé a dynamické (Goodacre et al. 2004).

Aktuální výskyt metabolitů uvnitř buňky totiž odráží nejen genovou expresi, ale také stimulaci vnějším prostředím, vývojovou fází nebo vzniklé genetické mutace. K porozumění metabolismu je tedy nutné znát dílčí metabolické procesy probíhající za určitých podmínek.

Při metabolomickém výzkumu je nutné si uvědomit, že některé metabolity se vyskytují u velkého počtu metabolických drah, jiné jsou pouze specifické pro určitá místa v organismu. Stejně jako některé metabolity se při změně prostředí výrazně mění, jiné zůstávají takřka beze změny (Villas-Bôas et al. 2007).

Dalším nepříjemným úskalím při studiu metabolitů je jejich omezený poločas života, protože jsou buňkou neustále přijímány, přeměňovány, degradovány a vylučovány. Tento neustálý proces tak zabraňuje analýze celého metabolomu najednou, a tak jsou při monitoringu metabolitů voleny různé strategické postupy.

Při extrakci metabolitů se preferenčně používá nemechanický přístup, který se nazývá chemická, fyzikální nebo enzymová lýze buňky. Při enzymatické lýzi buňky se používají lytické enzymy, které za spoluúčasti malé změny teploty a pH pouze mírně degradují získané metabolity. Při fyzikální lýzi se využívá prudké změny osmotického tlaku nebo teploty. Nejčastěji používaným přístupem je však chemická lýze, která používá k extrakci metabolitů organická rozpouštědla, jako jsou například metanol, etanol, acetonitril, chloroform, etylacetát nebo hexan. Tato rozpouštědla jsou vybrána nebo kombinována s ohledem na hydrofilitu či lipofilitu sloučenin. V dalším kroku následuje zakoncentrování metabolitů například pomocí extrakce na pevné fázi, superkritické fluidní extrakce nebo lyofilizace.

Při výběru analytické metody pro identifikaci metabolitů věnujeme pozornost převážně charakteru analyzovaného vzorku a komplexnosti sledovaných metabolitů. V posledních letech se ale ukazuje, že nejlepší výsledky jsou dosahovány při měření pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR) a hmotnostní spektrometrie (MS) s přímou infuzí vzorku do iontového zdroje (Musilová et al. 2011).

3.5.1 Softwarové nástroje v metabolomice

K vyhodnocování metabolomických dat lze využít širokou škálu software nebo online serverů, mezi které patří například BioSpider, Colmar, Fid nebo také XCMS. Všechny tyto software používá určitý způsob komparace naměřených výsledků s online databázemi a knihovnami.

XCMS Online je online verze původní verze XCMS. Jedná se o software, který je určený především ke statistickému vyhodnocení dat, které pochází z hmotnostní spektrometrie. Tento software je užitečný k práci s profilací metabolitů při objevování biomarkerů, přiřazení enzymatického substrátu, zjištění aktivity a případné specifity léčiv nebo jinému metabolomickému výzkumu. Používá koncepci nelineárního zarovnání retenčních časů, odpovídající filtraci, detekci vrcholu píku a také porovnání píků. Tato identifikace probíhá bez nutnosti přítomnosti interního standardu. U každého vzorku také vhodně koriguje retenční čas a následně porovnává jednotlivé analyty s knihovnou dostupných dat z databáze METLIN. XCMS je volně k dispozici v open-source licenci (Smith et al. 2006).

3.6 Kapalinová chromatografie

3.6.1 HPLC

HPLC je adaptací na tenkovrstvou chromatografii se zlepšenou separační účinností a detekčními limity. Na rozdíl od tenkovrstvé chromatografie je tato metoda spolehlivější, protože se jedná o instrumentální metodu, ovládanou softwarem. Používá se pro stanovení nečistot, forenzní účely apod. Stacionární fáze je obvykle tvořena silikagelem. Dále se pro extrakci využívají polární rozpouštědla jako je metanol nebo chloroform (Sonia et al. 2017).

3.6.2 UHPLC

UHPLC je modifikace HPLC, která se vyznačuje zejména odolností vůči vysokým tlakům. Mezi hlavní přednosti této separační techniky patří extrémní rychlost separace a velmi vysoká účinnost. Tato technologie se často používá v různých farmakologických či bionalytických studiích, ve kterých je předpokládán rychlý rozklad analytů a dlouhý čas měření způsobuje jejich degradaci. Velmi užitečné je spojení UPLC s hmotnostní detekcí MS/MS. Toto spojení přináší vynikající výsledky v oborech jako jsou toxikologie nebo farmakologie, kde je možné predikovat případnou toxicitu nebo také různé lékové interakce in vivo. V současnosti se také hojně využívá k identifikaci drog (Vijayalakshmi et Rao, 2020).

3.7 Hmotnostní spektrometrie

3.7.1 Kvadrupólové analyzátory

Obecně jsou kvadrupóly hmotností analyzátory, které se skládají ze 4 kovových tyčí, kdy vždy 2 protilehlé mají stejné stejnosměrné napětí, a to buď kladné nebo záporné. Zároveň všemi tyčemi kvadrupólu prochází střídavé napětí o vysoké frekvenci.

Na přístroji je přístroji mohou být nastaveny dva režimy měření, a sice režim scanu (SCAN) nebo režim „single ion monitoring“ (SIM). Režim SCAN pracuje na principu skenování všech procházejících iontů za současné kontinuální změny elektrického pole kvadrupólu. Naproti tomu režim SIM již pracuje pouze s ionty o přesné dané velikosti m/z a ostatní ionty jsou zachyceny na stěnách tyčí kvadrupólu. Z hlediska citlivosti je režim scan méně citlivý, avšak proti režimu SIM dokáže zachytit všechny ionty v iontovém zdroji. Režim SIM je ale používán častěji z důvodu citlivé kvantifikace (Friedecký et Lemr, 2012).

Kvadrupólové analyzátory mohou být buď jednoduché nebo trojitě, jejich výběr závisí na použití. Jednoduchý kvadrupól (Q) může být dále spojen například s lineární pastí (Q-LIT) nebo s analyzátorem doby letu (Q-TOF). Často se využívá tandemového spojení a vzniká trojitý kvadrupól (QqQ). Trojitě kvadrupóly jsou analyzátory, které se často používají pro MS/MS experimenty. Jejich výhodou je postupná selekce iontů, v prvním kvadrupólu dochází k excitaci iontů a následnou fragmentaci na drobnější molekuly, druhý kvadrupól slouží jako kolizní cela a třetí kvadrupól analyzuje takto vyselektované ionty (Nováková et al., 2013)

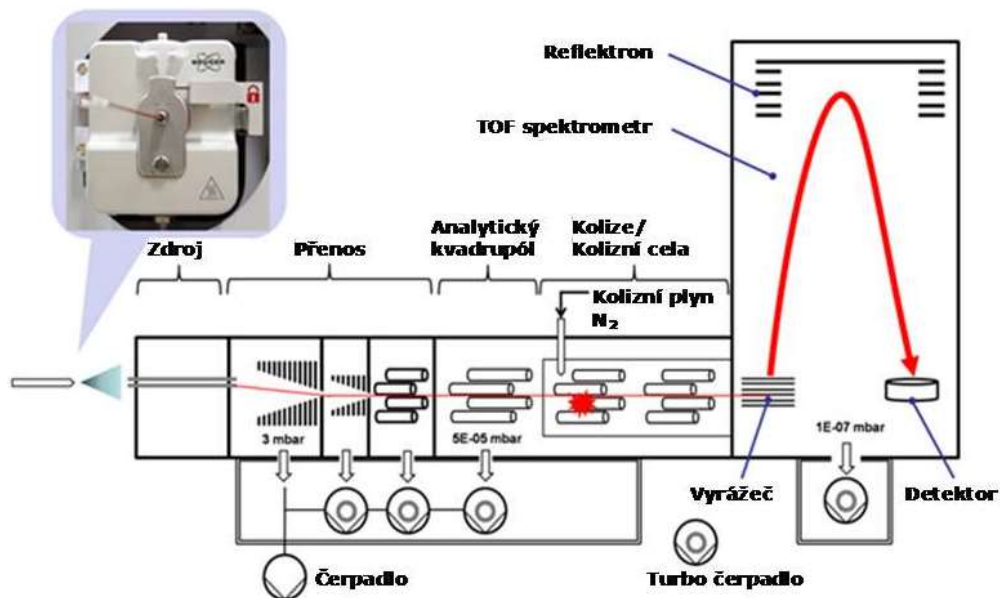
3.7.2 Analyzátor doby letu (TOF)

Analyzátor doby letu je pulzní hmotnostní analyzátor, u kterého jsou nejprve ionty při vstupu do analyzátorové trubice prudce urychleny a následně se měří čas, za který se dostanou k detektoru a podle tohoto údaje je přesně určen m/z . TOF byl původně vyvinut jako detektor používaný v kombinaci s plynovou chromatografií. Později, po nástupu ionizace pomocí MALDI došlo k dalšímu rozšíření jeho technických možností. V případě spojení spojení s MALDI ionizací se jedná o ideální spojení, a to zejména v případě měření makromolekul s velkým m/z (Guilhaus et al. 1997).

Analyzátor doby letu má totiž téměř neomezený hmotnostní rozsah. Úskalím při měření takto velkých makromolekul je ale jeho nižší citlivost. Často je také před analyzátozem doby letu zapojen další analyzátor, nejčastěji jím bývá kvadrupól nebo iontová past.

3.7.2.1 Q-TOF

Q-TOF (kvadrupól Time-of-Flight) je detekční technika, která je vhodná při měřeních s vysokým rozlišením a znalosti přesné hmoty analytu. Zároveň je možné tímto detektorem selektovat prekurzorový ion v kvadrupólu a získat tak MS-MS spektra, čímž získáme vyšší selektivitu a také případné ověření identity analytů porovnáním s MS-MS knihovnami (Westphal et al. 2002).



Obrázek 5: Schéma Q-TOF (přeloženo dle: Kulyyassov et Ramankulov, 2018)

4 Metodika

Vybrané stilbenoidy a jejich prenylované analogy byly vybrány na základě jejich uváděné i předchozími experimenty ověřené biologické aktivity (resveratrol, dihydroresveratrol, oxyresveratrol) a strukturní příbuznosti (prenylované deriváty výše zmíněných). Testy permeability byly prováděny na modelu vrstvy střevních buněk (Caco) rostoucích in vitro. V průběhu kultivace bylo odebíráno médium na bazální i apikální straně buněčné vrstvy a na konci pokusu byla provedena i extrakce buněčného obsahu. Analýza distribuce sledovaných látek i jejich potenciálních metabolitů proběhne pomocí LC/MS s ultravysokým rozlišením (Q-TOF). Výstupy byly zpracovávány pomocí vyhodnocovacího software bruker DataAnalysis, Mass Frontier, kvantifikace bude provedena softwarem TASQ. Statistické vyhodnocení bylo realizováno pomocí softwaru Statistica a MS Excel.

4.1 Materiál

4.1.1 Použité vzorky

Prenylované látky byly získány od doc. PharmDr. Karla Šmejkal, Ph.D. z VFU. Brno. Všechny vzorky byly zředěny v DMSO a poté HBSS (Hanksův vyvážený solný roztok) v den experimentu. Konečná koncentrace 20 μM byla založena v předchozích testech cytotoxicity MTT (3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-difenyltetrazoliumbromid). Koncentrace DMSO v konečném roztoku nepřesáhla 2%, aby se předešlo jeho vlivu na monovrstvu Caco-2.

4.1.2 Interní standard

Jako interní standard byl použit vzorek trans -resveratrolu (tRes), který byl získán od Merck (Darmstadt, Německo).

4.1.3 Chemikálie

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

4.2 Instrumentální část

4.2.1 Laboratorní zařízení

Inkubátor 1000, Heidolph – Německo

Centrifuga Rotanta 460R – Německo

Vortex Phoenix Instrument RS-VF10 – Německo

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

4.2.2 UHPLC

UHPLC Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific – USA

4.2.3 Q-TOF

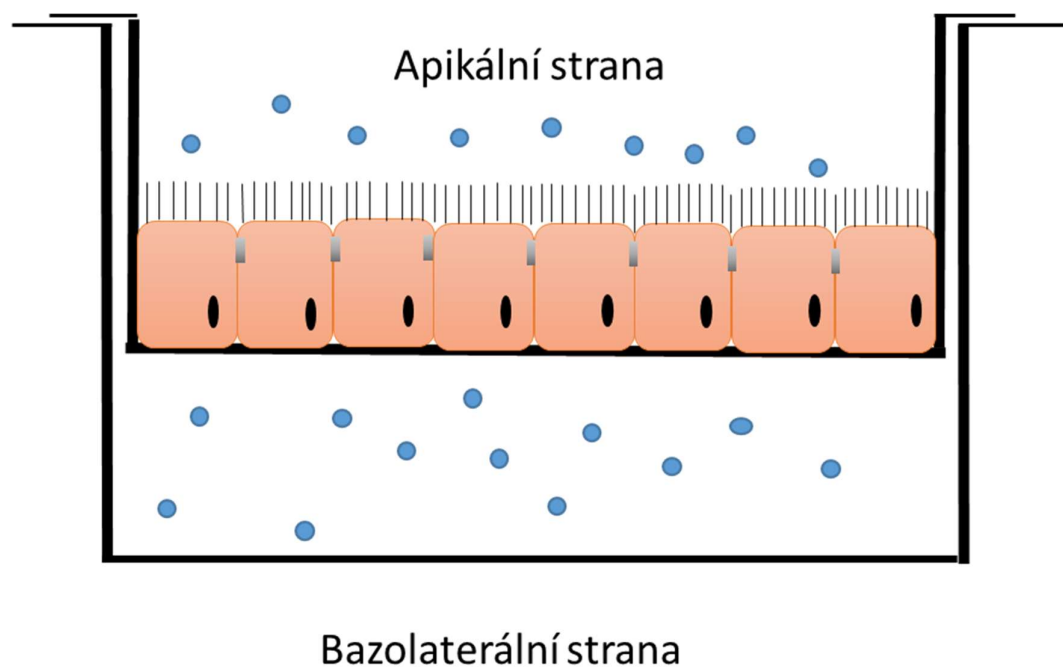
MS Q-TOF Impact II Bruker Daltonic – Německo

4.3 Metoda

4.3.1 Test propustnosti

Test propustnosti je prováděn pomocí Caco-2 buněk a slouží k simulaci propustnosti membrány lidského střeva a případnému intracelulárnímu metabolismu látek in vitro. Tyto testy jsou prováděny za účelem predikce chování léčiv nebo dalších látek in vivo. Je-li to možné, testy in vitro jsou upřednostňovány oproti pokusům na zvířatech.

Buňky Caco-2 je linie buněk získaná z karcinomu tlustého střeva (Fogh et al. 1977). Buňky vhodně nasimulují prostředí buněk střevního epitelu. Na následujícím obrázku (obrázek 6) je grafické znázornění průběhu molekul z apikální na bazolaterální stranu.



Obrázek 6: Caco-2 linie buněk

4.3.2 Měření integrity monovrstvy

Filtrační vložky s monovrstvou buněčné linie Caco-2 byly promyty třikrát HBSS, předeřhřátým na 37 ° C a upraveným na pH 7,4. Transepiteliální elektrický odpor (TEER) musel být alespoň 600 Ω, pro zajištění integrity buněčné bariéry. Poté bylo přidáno Luciferovo žluté barvivo o koncentraci 25 uM, a destičky byly inkubovány při teplotě 37 ° C a 5% CO₂ v atmosféře po dobu 1 hodiny, za současného třepání (150 ot./min). Destičky byly měřeny ve čtečce Tecan Infinite M200 (excitační/emisní vlnová délka 480 nm/530 nm). Následně byly použity inserty s integritou vyšší než 95 %.

4.3.3 Extrakční metoda pro získání vzorků

Kultivační inserty byly třikrát promyty kultivačním médiem (HBSS) a 500 ul původního roztoku o koncentraci

20 uM bylo nanášeno na apikální stranu. Na stranu bazolaterální bylo přidáno 1000 ul HBSS. Vzorky z apikální strany (50 ul) byly odebrány okamžitě (časový bod 0 h). Desky s inserty byly inkubovány na rotační třepačce (150 otáček za minutu) v CO₂ inkubátoru (37 ° C, 5% CO₂ atmosféra). Vzorky z bazolaterální strany byly odebrány v časových intervalech 0,5, 1, 1,5, 2, 3 a 4 hodiny. 500 ul HBSS bylo odebráno a nahrazeno 500 ul čerstvého HBSS. Nakonec byly odebrány vzorky z apikální strany a inserty byly třikrát promyty HBSS.

Byl měřen transepiteliální elektrický odpor (TEER), který demonstruje, zda nedochází k nedochází k porušení celulární bariéry (> 500 Ω).

Pro vyhodnocení intracelulárního obsahu testovaných sloučenin byly zbývající buňky na inzertech extrahovány 100% methanolem. Všechny vzorky byly až do analýzy skladovány při -80° C. Celý kultivační experiment byl proveden ve třech časově nezávislých opakováních.

4.3.4 Podmínky analýzy

Stanovení stilbenoidů probíhalo pomocí LC-MS s ultravysokým rozlišením a vysokou přesností stanovení molekulové hmotnosti (HRAM). Chromatografický systém se skládal z chromatografické jednotky UPLC Ultimate 3000 Thermofisher Scientific – USA a Q-TOF Impact II od Bruker Daltonik.

Ionizace: elektrosprej (ESI)

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

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

Vzorky byly zředěny v poměru 1:1 s roztokem methanolu a kyseliny mravenčí (99:1).

Teplota kolony: 35 °C

Autosampler chlazený na 10 °C

Nástřík: 5 µl

Rychlost průtoku: 0,2 ml

Gradientová eluce: mobilní fáze A: 0,1% kyselina mravenčí, mobilní fáze B: 100% methanol
V následující tabulce je znázornění průběh

Tabulka 2: průběh gradientové eluce

Čas v minutách	Poměr mobilní fáze B v %
0	20
3	50
6	100
15-24	20

Kalibrace přesnosti měření m/z byla provedena na formiát sodný

Parametry ionizačního zdroje: End plate offset: 500 V

V Capillary: 3 000 V

Tlak zmlžujícího plynu: 0,3 Barů

Průtok sušícího plynu: 4L/min

Teplota zdroje: 250 °C

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

Měření probíhala v režimu FullScan v pozitivním módu

Měření probíhalo ve všech zmíněných timepointech a mezi odlišnými vzorky byly nasazeny slepé vzorky (blank). Mezi měřené vzorky jednotlivých časových odběrů byl vždy po 5 nástřících vložena analýza rozpouštědlového blanku a po každých 10-ti vzorcích vzorek kontroly kvality obsahující směs standardů o koncentraci 100 ng/mL.

4.4 Vyhodnocování dat

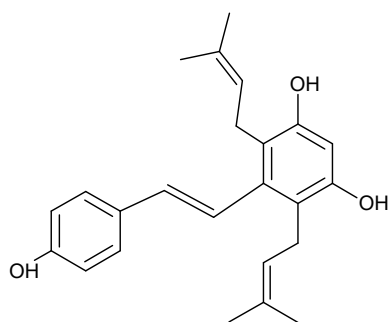
Parametry metody pro měření MS byly nastaveny v ovládacím software Otof Series 4.0, (Bruker Daltonik – Německo) a Chromeleon Xpress (Thermo Fisher Scientific – USA). Pro tvorbu jednotlivých sekvencí a pro předběžné zpracování dat byl použit software HyStar verze 3.2 SR4. Pomocí software Metabolite Detect 2.0 SR 4 (Bruker Daltonik– Německo) byla prováděna diferenční analýza spekter a chromatografů. Výstupní data byla zpracována programem DataAnalysis 4.3 (Bruker Daltonik – Německo). Metabolomická necílená analýza byla prováděna v cloudovém software XCMS Online (v Scripps Research – Florida) a pomocí volně dostupného software MZmine 2.52.

4.4.1 Seznam testovaných stilbenoidů

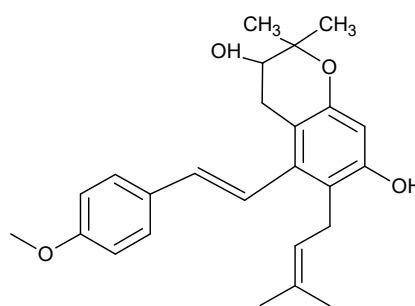
V následující tabulce (tabulka 3) jsou znázorněny názvy sloučenin, které nám byly dodány spolu s jejich strukturálními vzorci, zkrácené názvy, který jsme zvolili při měření, sumární vzorce, přesné hmoty neutrofilních molekul a přesná hodnota měřeného m/z.

Tabulka 3: seznam pozorovaných stilbenoidů a jejich přesná specifikace

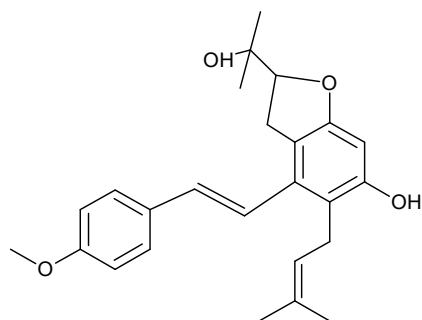
Název	Název při analýze	Sumární vzorec	Přesná hmota neutrální molekuly	Meřená přesná hodnota m/z [M +H] ⁺
N-MS-30-F2	MS1	C ₂₄ H ₂₈ O ₃	364,4773	365,2117
N-MS-13-F5	N1	C ₂₅ H ₃₀ O ₄	394,5033	395,2222
N-MS-27-B4	N2	C ₂₅ H ₃₀ O ₄	394,5033	395,2222
N-MS-12F4-C2	N4	C ₂₅ H ₃₀ O ₃	378,5039	379,2273
N-MS-70-B1	N5	C ₂₅ H ₃₀ O ₄	394,5033	395,2222
N-MS-22-B2	N6	C ₂₅ H ₃₀ O ₄	394,5033	395,2222



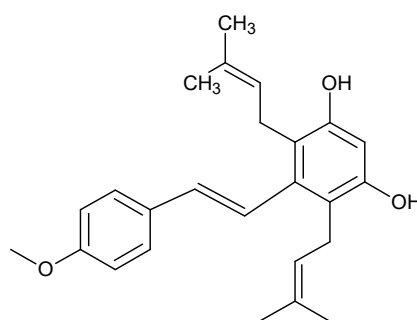
N-MS-30-F2



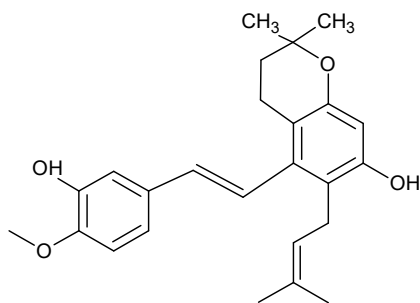
N-MS-13-F5



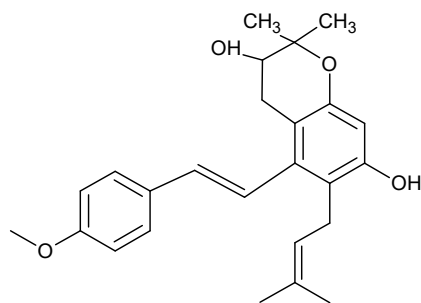
N-MS-27-B4



N-MS-12F4-C2



N-MS-70-B1



N-MS-22-B2

Obrázek 7: strukturální vzorce prenylovaných stilbenoidů a jejich technické názvy

4.5 Kalibrační křivky

V následující tabulce (tabulka 4) jsou znázorněny rovnice přímek jednotlivých standardů. Kalibrace byla tvořena body o koncentracích 100, 200 a 600 ng/ml. Jednotlivé kalibrační body byly připraveny do 100% metanolu stejné šarže, která byla použita při přípravě vzorků.

Sloučeniny	Rovnice kalibrační křivky	Linearita [ng/mL]
N-MS-30-F2	$y = -7928,1657 + 2082,7317 \cdot x$	100-600
N-MS-13-F5	$y = 5684,6151 + 7474,9712 \cdot x$	100-600
N-MS-27-B4	$y = -35784,7916 + 11172,4435 \cdot x$	100-600
N-MS-12F4C2	$y = -6176,9566 + 2694,2908 \cdot x$	100-600
N-MS-70-B1	$y = -6176,9566 + 2694,2908 \cdot x$	100-600
N-MS-22-B2	$y = -35784,7916 + 11172,4435 \cdot x$	100-600

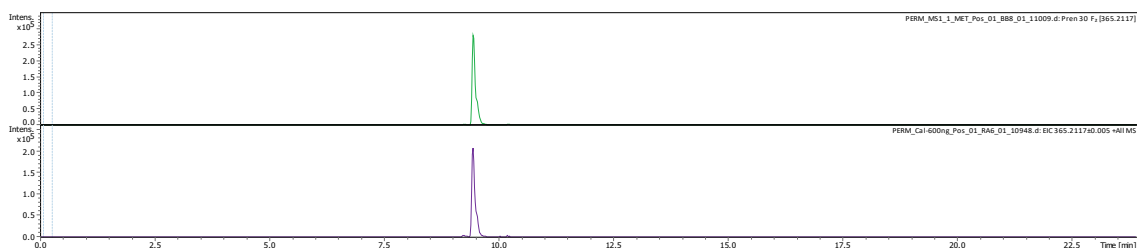
Tabulka 4: Rovnice kalibračních křivek vybraných prenylovaných sloučenin.

Grafické zobrazení kalibračních křivek je zpracováno jako příloha 1. Z grafů je zřejmé, že linearita kalibračních přímek je ve všech případech vyhovující.

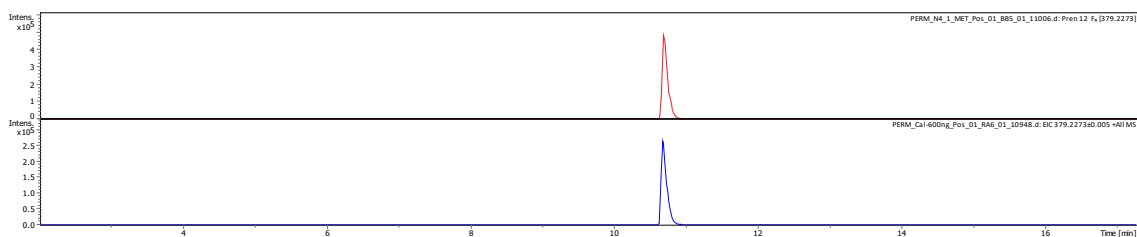
5 Výsledky

5.1 Data Analysis 4.3.

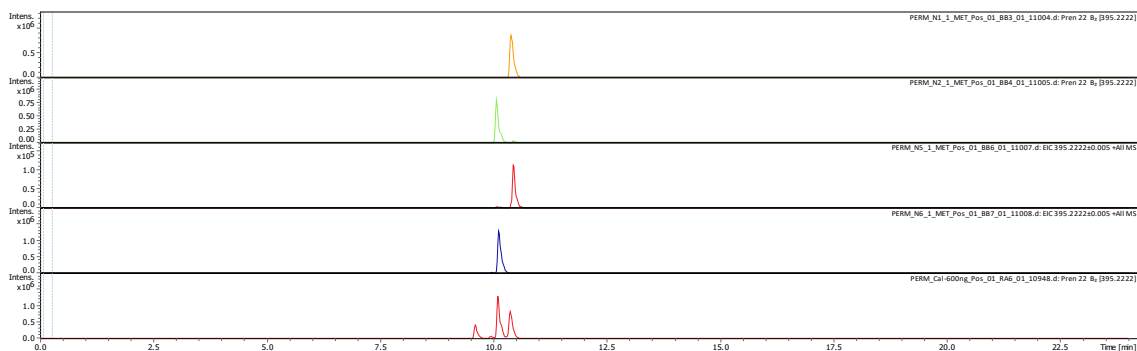
První krok vyhodnocování proběhl pomocí softwaru Data Analysis. Nejprve jsme si ověřili porovnáním metanolového extraktu s koncentračně nejvyšším kalibračním bodem, zda se v uvedených vzorcích nachází ionty o molekulových hmotnostech odpovídajících m/z jednotlivých testovaných látek, pro ověření jejich skutečné přítomnosti ve vzorcích.



Obrázek 8 : Molekulová hmotnost MS1



Obrázek 9: Molekulová hmotnost N4



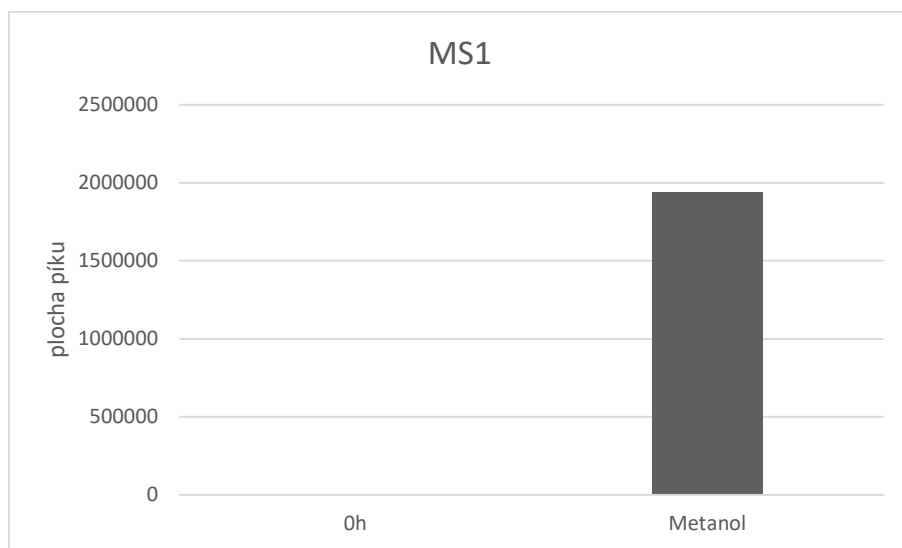
Obrázek 10: Molekulová hmotnost N1, N2, N5, N6

Z obrázků (obrázek 8,9,10) je patrné, že uvedené molekulové hmotnosti se nachází ve stejném retenčním čase jako kalibrační standard a je tedy možné verifikovat jejich přítomnost. Píky pro ionty analytů N1, N2, N5, N6 se stejnou molekulovou hmotností (izobarické látky) se liší pouze svými retenčními časy, které byly identifikovány porovnáním s retenčními časy jednotlivých standardů.

5.2 Průběh metabolismu prenylovaných stilbenoidů a monitoring jejich transportu

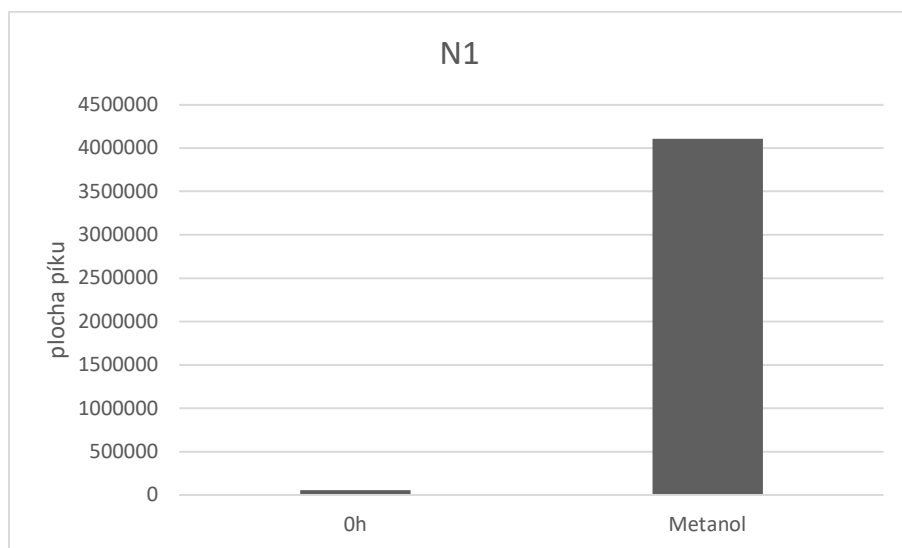
Na následujících grafech je znázorněn výskyt prenylovaných stilbenoidů na apikální straně (0h) a uvnitř Caco-2 buněk (MET). Na bazolaterální straně nebyl nalezen žádný z testovaných analytů, proto není tato hodnota v grafech zahrnuta. Měření byla provedena ve dvou opakováních.

5.2.1 N-MS-30-F2



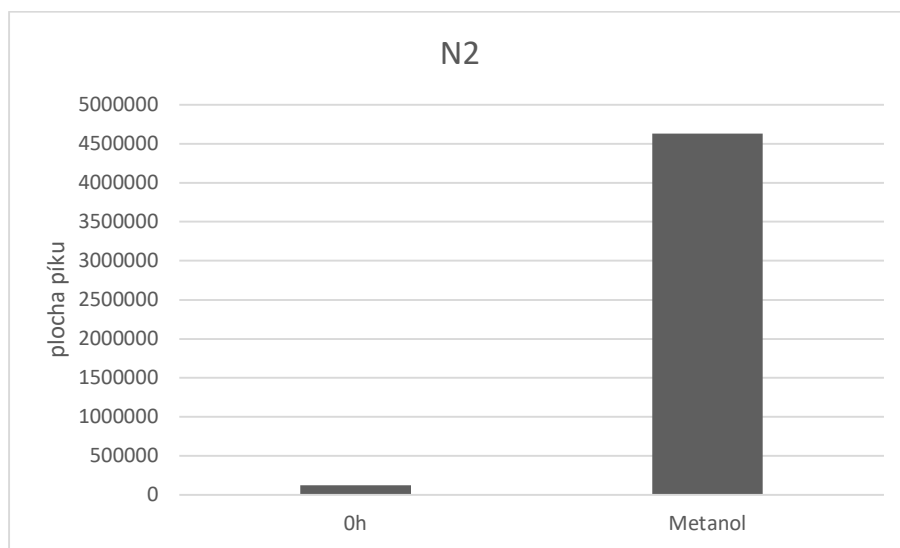
Obrázek 11: krabicový graf látky MS1

5.2.2 N-MS-13-F5

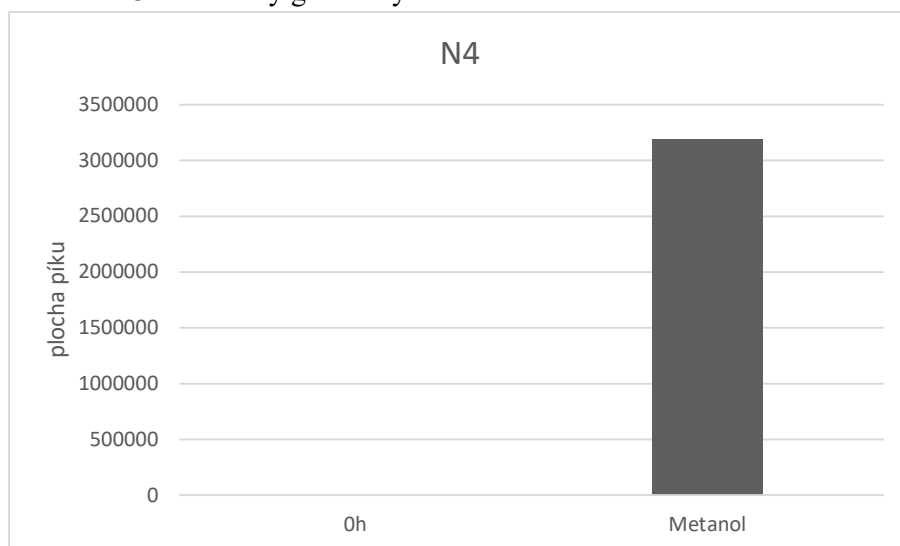


Obrázek 12: krabicový graf látky N1

5.2.3 N-MS-27-B4

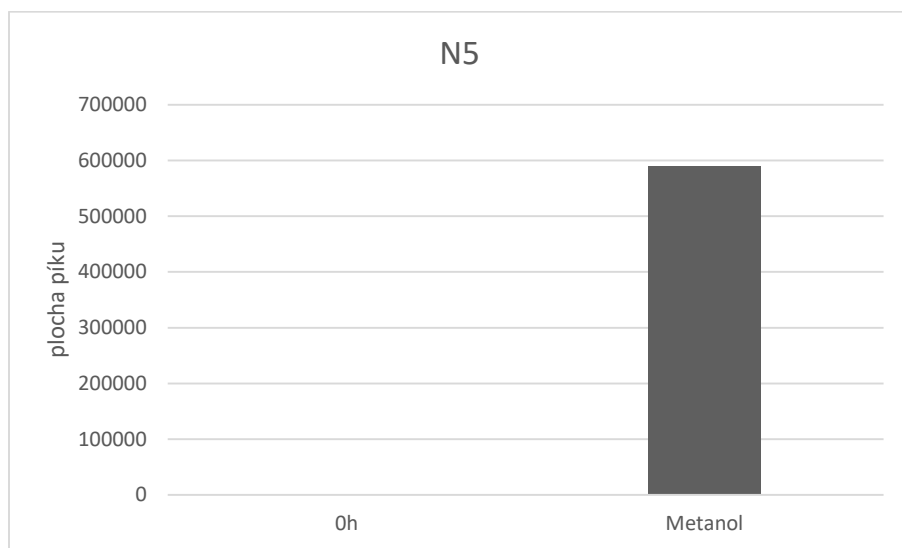


Obrázek 13: krabicový graf látky N2



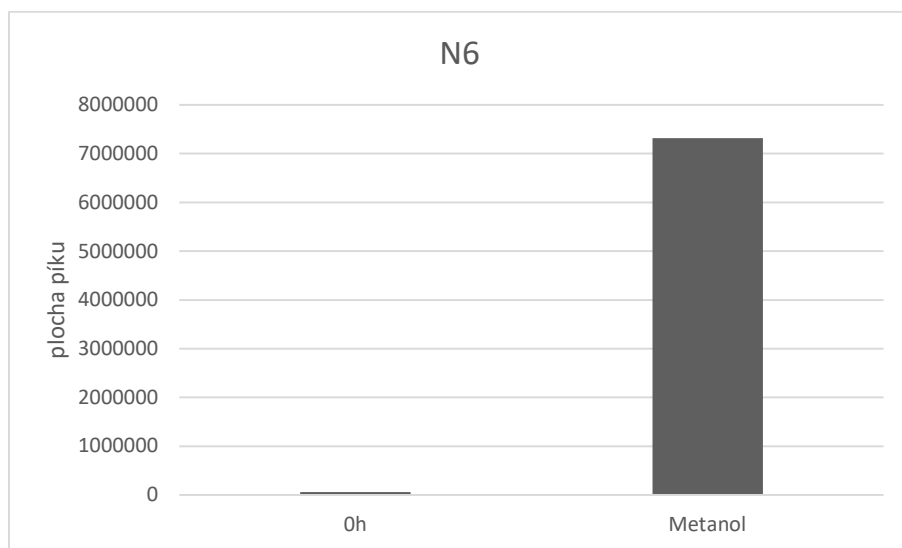
Obrázek 14: krabicový graf látky N4

5.2.4 N-MS-70-B1



Obrázek 15: krabicový graf látky N5

5.2.5 N-MS-22-B2



Obrázek 16: krabicový graf látky N6

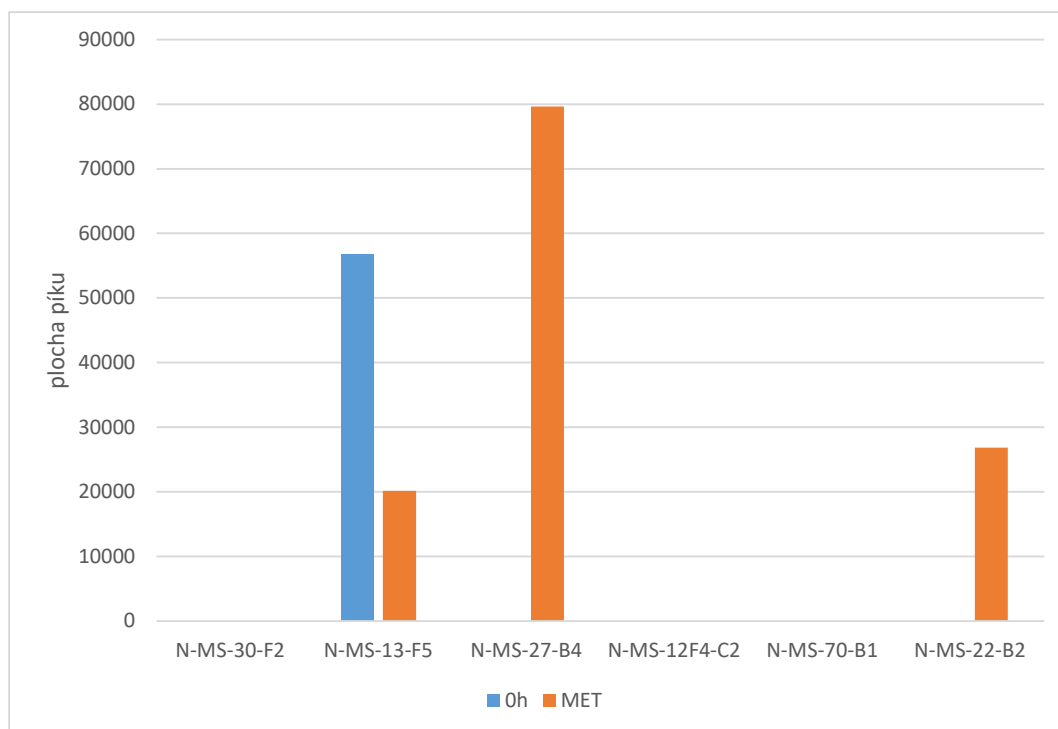
Z grafů je patrné, že v buňkách byla v největším množství akumulována sloučenina N-MS-22-B2. V nejnižších koncentracích pak byla detekována látka s kódem N-MS-30-F2.

5.3 Tvorba metabolitů

Vybrané prenylované sloučeniny tvořily na apikální straně (0h) a uvnitř Caco-2 buněk (MET) hydroxylované a glukoronidové metabolity. Výskyt těchto metabolitů byl pouze v prvních dvou biologických opakováních. Tento fakt lze připisovat tomu, že analýza třetího nezávislého biologického opakování proběhla s delším časovým odstupem, a tak mohlo dojít k další neznámé metabolizaci či rozpadu analytů.

5.3.1 Výskyt hydroxylovaných metabolitů vybraných prenylovaných stilbenoidů

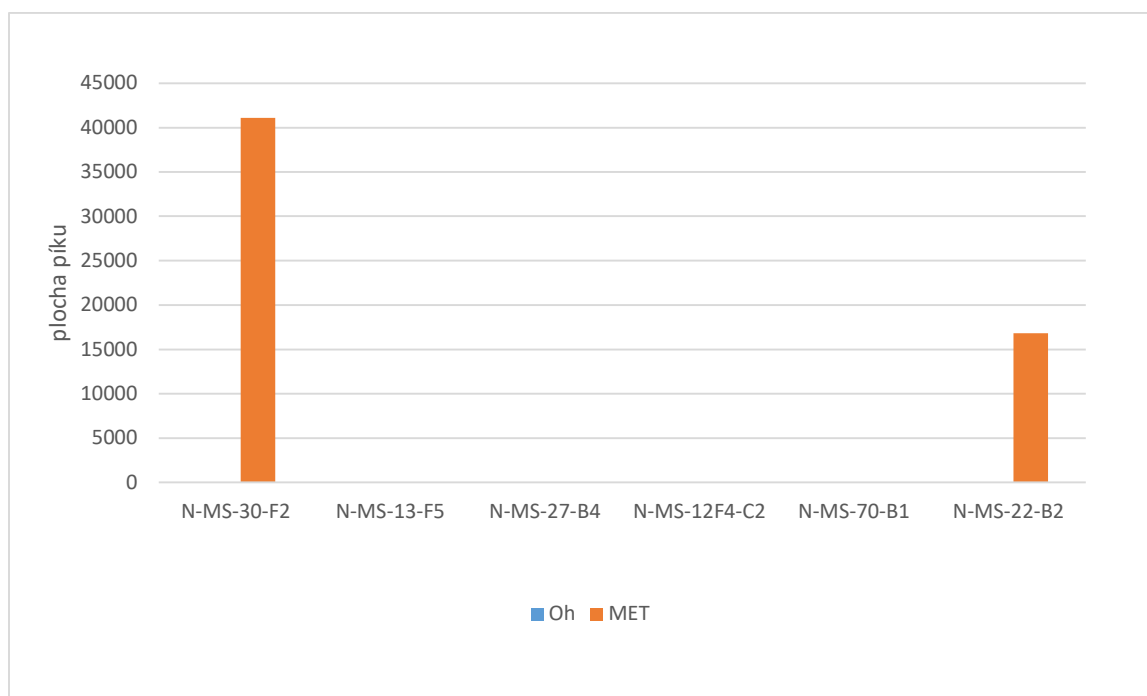
Z uvedeného grafu (obrázek 17) vyplývá, že u vybraných sloučenin byly nalezeny hydroxylové metabolity ve třech ze šesti uvedených látek. Hydroxylové metabolity byly až na jedinou výjimku nalezeny pouze v methanolovém extraktu, což vypovídá o metabolizaci stilbenoidů uvnitř buněk.



Obrázek 17: Tvorba hydroxylových metabolitů vybraných sloučenin

5.3.2 Výskyt glukoronidových metabolitů vybraných stilbenoidů

Glukoronidové metabolity, které znázorňuje obrázek 18, byly nalezeny pouze u dvou látek ze šesti, a to výhradně v methanolových extraktech. Metabolizace tedy probíhá stejně jako v případě hydroxylových metabolitů uvnitř buněk.



Obrázek 18: tvorba glukoronidových metabolitů vybraných stilbenoidů

5.4 Interference

K výsledkům, které vypovídají o tom, že vybrané prenyly se nachází nejvíce v methanolovém extraktu buněk (intracelulární frakce) jsme došli pravděpodobně kvůli nevhodné homogenizaci média na začátku analýzy a nedostatečné distribuci sloučenin napříč celým médiem. V 0. hodině na apikální straně by teoreticky měla být nalezena mnohem vyšší koncentrace prenylovaných stilbenoidů odpovídající přidávanému množství testovaných látek. Nelze ale také vyloučit okamžitý přechod těchto látek do Caco-2 buněk díky jejich velmi vysoké afinitě vůči biologickým membránám.

5.5 XCMS Online

V případě této práce bylo XCMS použito k porovnání jednotlivých datových sad, které byly vyexportovány z Data Analysis ve formátu centroidových spekter. Základním požadavkem bylo porovnávat data mezi sadami, ve kterých nemají analyzované látky stejnou molekulovou hmotnost, aby došlo k zachycení unikátních látek.

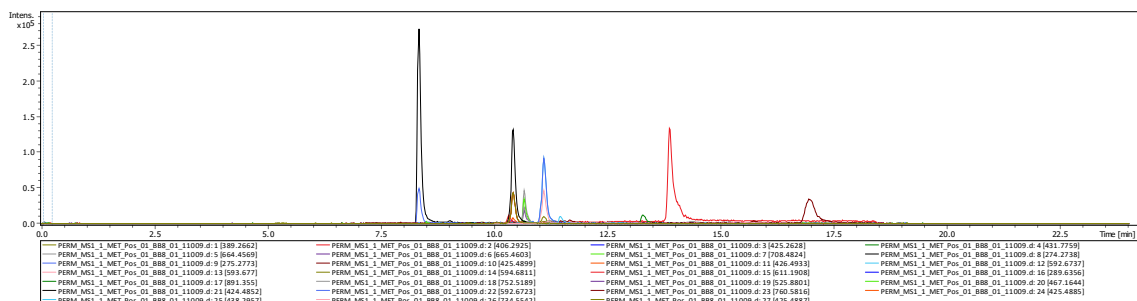
Vzhledem k předchozím výsledkům testujícím přítomnost testovaných látek v jednotlivých vzorcích jsme zvolili taktiku porovnání metanolového extraktu, finálního odběru (4. hodina) a výchozího časového bodu (0. hodina). Porovnání proběhlo následujícím způsobem, který je znázorněn v tabulce č.5.

Tabulka 5: strategie porovnání dat

Datová sada 1	Datová sada 2
MS1 4h	N1 0h
MS1 MET	N2 0h
N1 4h	MS1 0h
N1 MET	N4 0h
N2 4h	N4 0h
N2 MET	MS1 0h
N4 4h	N6 0h
N4 MET	N5 0h
N5 4h	MS1 0h
N5 MET	N4 0h
N6 4h	N4 0h
N6 MET	MS 0h

Výsledky z komparačních analýz jednotlivých skupin jsme na základě předem zvolených kritérií, kterými byly m/z, retenční čas, plocha píku a statistická signifikance (p-hodnota), vyfiltrovali a získali jsme několik desítek významných kandidátních iontů (m/z). Všechny nalezené hmotnosti spolu s retenčními časy (viz. přílohy) jsme zpětně vyhodnotili v Data Analysis a tímto způsobem jsme našli zhruba 2 desítky unikátních píků. Nejhojněji se vyskytovaly v rozmezí retenčních časů 7,5 – 17,5 min.

Nejvíce těchto unikátních píků bylo nalezeno ve vzorku MS1, proto je následující obrázek (obrázek 19) právě chromatogram ze vzorku MS1.

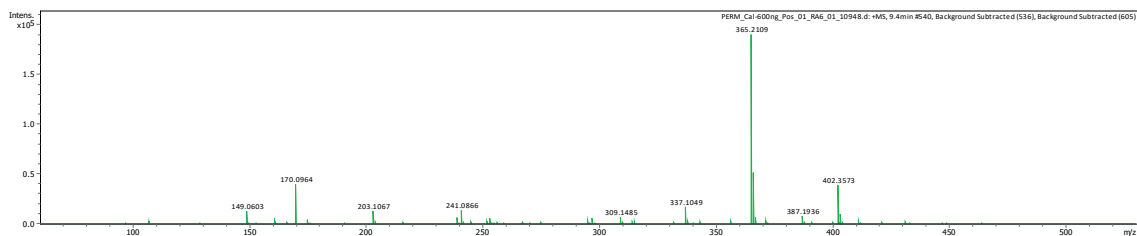


Obrázek 19: Unikátní píky v methanolovém extraktu vzorku ošetřeném MS1

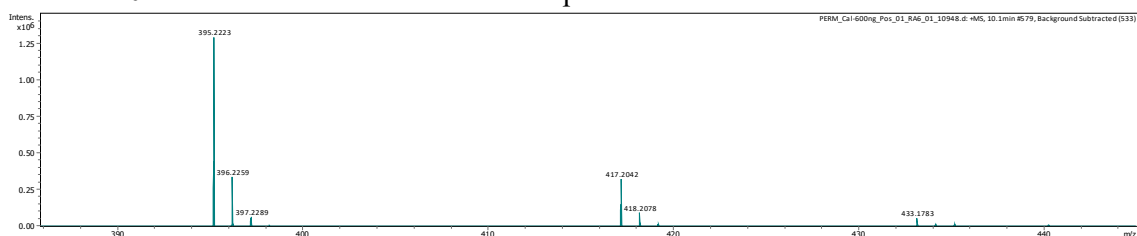
Pomocí výpočtů jsme jednotlivé hmotnosti porovnali s pravděpodobnými addukty nejobvyklejších očekávaných konjugátů výchozích sloučenin, vygenerovaných pomocí software Excel IonCalc. V tomto případě jsme však nedošli k žádné shodě.

Dále jsme se pokusili vybrané látky identifikovat pomocí on-line knihovny dostupných spekter Compound Crawler (Bruker Daltonik, Německo), avšak i v tomto případě jsme nedošli k žádnému výsledku, který by nám napověděl, o jaké látky se jedná.

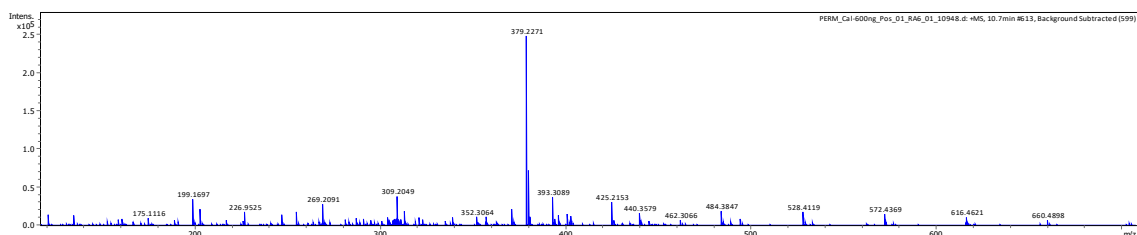
Dalším postupem byla vizuální analýza jednotlivých HRMS spekter po odečtení pozadí před a za píkem.



Obrázek 20: zobrazení MS1 ve hmotnostním spektru



Obrázek 21: Zobrazení N1,N2,N5,N6 ve hmotnostním spektru



Obrázek 22: Zobrazení N4 ve hmotnostním spektru

Z uvedených obrázků (obrázek 20,21,22) hmotnostních spekter vyplývá, že jednotlivé unikátní features získané pomocí necílené analýzy (XC/MS) jsou většinou součástí komplexnějších spekter obsahujících další signifikantní ionty vzniklé pravděpodobně fragmentací v iontovém zdroji. Tato skutečnost naznačuje, že pro zevrubnější identifikaci nalezených unikátních látek by bylo nezbytné provést jejich izolaci a další následné konfirmační analýzy např. pomocí nukleární magnetické rezonance.

7 Diskuze

Při metabolismu přírodních látek hraje klíčovou roli jejich biologická aktivita, na níž závisí, zda se vůbec dané látky dostanou do krevního řečiště. Pokud se stilbenoidy dostanou do tlustého střeva, transportují se následně pomocí enterocytů ve formě konjugátů.

Cílem této práce bylo zjistit, zda se vybrané stilbenoidy a jejich prenylovaná analoga přenáší z apikální na bazolaterální stranu membrány Caco-2 buněk a za jakých podmínek.

Během vyhodnocování dat bylo zjištěno, že některé prenylované sloučeniny byly měřitelné na apikální straně v 0. hodině, avšak při přechodu přes buňky Caco-2 jsou v nich zadrženy a dále na bazolaterální stranu nepřechází žádná z nich. Tato skutečnost nám vypovídá o tom, že první hypotéza, která předpokládala přenos stilbenoidů z lumen střevní sliznice směrem do krevního řečiště nebyla zcela správná.

Druhá hypotéza nebyla potvrzena, nicméně k tvorbě hydroxylových a glukuronidových komplexů prokazatelně docházelo, pouze by nebyly dle měření v našem modelu transportovány do krevního oběhu. Je však důležité zmínit fakt, že k přenosu do krevního řečiště mohlo docházet, ale látky mohly vytvořit komplexní sloučeniny s biologickými makromolekulami, které nebyly v našich experimentech uvažovány, a tudíž ani není možné předpovědět jejich molekulové struktury a hmotnosti (Lu et al. 2013).

Nesmíme však opomenout, že potenciál přítomnosti prenylovaných sloučenin uvnitř buněk není zanedbatelný. Výše zmíněné studie dokonce ukazují, že depotní zásoby resveratrolu uvnitř lumen jsou cennější než jeho koncentrace v krevním řečišti, protože v případě střevní sliznice se ukazuje, že se stilbenoidy zabraňují narušení nebo zmírňují následky narušení střevní sliznice způsobené H_2O_2 (Carrasco-Pozo et al., 2013). Tato narušení střevní sliznice nejčastěji způsobují zánětlivá střevní onemocnění, která mají vliv na mnoho dalších přidružených chorob mezi které patří dle nedávných studií i mnoho neurologických či autoimunitních onemocnění, které dříve nebyly vůbec s gastrointestinálním traktem spojovány (Turner, 2009; Rao et Gershon, 2016). Podobný potenciál, jako mají výše zmíněné stilbenoidy, byl prokázán i u jejich prenylovaných derivátů (Leláková et al. 2020), proto se jeví námi zjištěná akumulace těchto látek v buňkách střevní sliznice jako poměrně významný fakt.

Na prenylované stilbenoidy měřené v naší studii se ale v některých případech navazují glukuronidové konjugáty nebo dochází k jejich hydroxylaci. Tato skutečnost je zajímavá z hlediska jejich dalšího potenciálního antimikrobiálního či antioxidačního působení, protože je již známé, že strukturální změny stilbenoidů mohou zlepšit jejich biologickou dostupnost (Walle. 2011).

Zajímavé porovnání nabízí výsledky experimentu Jarosova et al. (2020), který byl realizován taktéž na buněčné linii Caco-2 buněk. Tento konkrétní experiment a další podobné poukazují ale na opačný trend. *Trans*-resveratrol, *cis*-resveratrol a dihydroresveratrol se chovají v daném systému zcela odlišným způsobem a dochází k výrazné metabolizaci na glukuronidové a sulfátové metabolity. Je však nutné si uvědomit, že *trans* a *cis* resveratrol jsou molekuly, které mají sice stejný základ jako molekuly v našem experimentu, ale jejich rozpustnost i afinita vůči Caco-2 buňkám je zcela jiná z důvodů odlišnosti jejich struktur.

Zajímavým zjištěním byla detekce unikátních píků, které jsme našli pomocí XCMS. Tyto píky mohou zahrnovat různé potenciálně biologicky aktivní molekuly, které mohou být

deriváty testovaných látek, nebo mohou být endogenního původu a být aplikací prenylových stilbenů pouze indukovány a mohou ovlivňovat další biologicky významné reakce.

Tato práce nabízí prostor pro další výzkum těchto molekul například pomocí nukleární magnetické rezonance, která by mohla objasnit jejich přesnou strukturu a následně přiblížit jejich biologickou funkci v organismu.

Důležité je ale také zmínit fakt, že studie na buněčných liniích Caco-2 buněk nemohou zcela objasnit, k jakým metabolickým změnám dochází při perorálním podání. Stilbenoidy mohou totiž při průchodu trávicím traktem být metabolizovány buňkami jiných tkání. Studie, které popisují nízkou biologickou dostupnost resveratrolu právě na tento fakt poukazují (Goldberg et al. 2003).

Dále dochází k velmi zajímavým výsledkům při intravenózním podání resveratrolu, například ve studii Vijayakumar et al. (2016), kde jsou experimenty prováděny na myším C6 gangliomu resveratrol při intravenózním podání zdravým myším vykazoval zhruba 10x vyšší poločas rozpadu v krevním séru než při perorálním podání roztoku resveratrolu. Tento experiment opět potvrzuje předpoklad, že resveratrol a jeho prenylovaná analoga jsou silně metabolizovány gastrointestinálním traktem

K velmi zajímavým zjištěním došel i Wang et al. (2019) ve studii, kde u myši s přidaným resveratolem v krmivu došlo ke změně střevní mikrobioty oproti myším, které byly krmeny standardní stravou. Střevní mikrobiota byla obohacena rody *Bacteroides*, *Lachnospiraceae*, *Blautia*, *Lachnoclostridium*, *Parabacteroides* a *Ruminiclostridium*. Navíc došlo ale k významnému zjištění, které ukazuje, že i transplantací této stolice je možné obézním myším snížit nárůst hmotnosti a zvýšit citlivost na inzulín. Tato stolice navíc snížila celkovou zánětlivost a zlepšila funkci střevní bariéry. Tento pokus byl prováděn na myších, ale transplantace stolice je nyní u lidí v medicíně často diskutovaným tématem a přináší velmi významné výsledky, které nabízí řešení v léčbě velké většiny střevních onemocnění, ale i onemocnění, která se vyskytují v zcela jiné části lidského těla, ale byla u nic prokázána jistá korelace s odlišným složením střevního mikrobiomu v porovnání se zdravými jedinci.

Experiment, který se zabýval protizánětlivou aktivitou prenylovaného stilbenoidu macasiamenenu F, který byl extrahován z rostliny *Macaranga siamensis*, byl proveden také na Masarykově univerzitě. U tohoto stilbenoidu byly zjištěny také protizánětlivé účinky, proto se jeví jako zajímavý kandidát pro další *in vivo* experimenty. Zmíněný experiment byl prováděn *in vitro* na lidských monocytech THP-1 a THP-1-XBlue™-MD2-CD14, BV-2 myších mikrogliích a *ex vivo* na vybraných mikrogliích myšího mozku. Zkoumána byla schopnost stilbenoidu zasahovat do zánětlivých kaskád. Při pokusu bylo zjištěno, že zmíněný prenylovaný stilbenoid je schopen dramaticky inhibovat ztrátu mikroglií, expresi genů a proteinů, které jsou stimulovány lipopolysacharidy a tím snížit celkový počet cytokinů (Leláková et al. 2020).

Nabízí se tedy široká škála využití pro stilbenoidy a jejich prenylovaná analoga v mnoha odvětvích lékařství a farmacie, protože jejich potenciální účinek v gastrointestinálním traktu cílí na mnoho zdravotních problémů dnešní moderní společnosti.

8 Závěr

V této diplomové práci bylo testováno chování celkem 6-ti prenylovaných stilbenoidů a jejich případných metabolitů na Caco-2 linii buněk reprezentujících *in vitro* model střevní sliznice.

Cílem práce bylo sledovat jejich metabolický osud při transportu buňkami střevní sliznice a popsat dynamiku procesu pomocí LC/MS s ultravysokým rozlišením a vysokou přesností určení molekulové hmotnosti.

Předpokladem bylo, že stilbenoidy budou polarizovaně transportovány buňkami střevní sliznice směrem z lumen do krevního oběhu a při tomto transportu bude docházet k cíleným změnám molekul přenášených stilbenoidů.

Výsledky naší práce ukazují, že prenylované stilbenoidy díky své afinitě ke střevním buňkám přechází ihned směrem dovnitř buněk. Tento fakt je potvrzen skutečností, že na apikální straně jsme detekovali testované látky pouze v 0h, a to jen v některých případech. Nejzrůsáhlejší metabolizaci ze všech testovaných látek podstoupila sloučenina N-MS-22-B2, kdy byl uvnitř buněk identifikován jak glukoronidový konjugát, tak hydroxylovaný metabolit. Jako cílovou tkáň pro biologickou aktivitu prenylovaných stilbenů lze tedy na základě našich výsledků označit právě buňky stěny.

Hypotéza č. 1 je tedy částečně vyvrácena, protože na bazolaterální straně nebyla nalezena žádná z původních sloučenin. Avšak není zcela možné vyvrátit hypotézu č. 2, protože k cíleným chemickým změnám docházelo minimálně z hlediska bilance (úbytek původní látky). V našich silách však není u takto konjugovaných sloučenin přesně předpovědět k jaké změně chemické struktury právě dojde.

Obecně ale stilbenoidy a jejich prenylované analoga vykazují slibný farmakologický potenciál u mnohých onemocnění.

9 Literatura

Alonzi T, Fattori E, Lazzaro D, Costa P, Probert L, Kollias G, Ciliberto G, 1998. Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis. *The Journal of Experimental Medicine*. **187**: 461–468.

Andrabi SA, Spina MG, Lorenz P, Ebmeyer U, Wolf G, Horn TFW. 2004. Oxyresveratrol (trans-2,3',4,5'-tetrahydroxystilbene) is neuroprotective and inhibits the apoptotic cell death in transient cerebral ischemia. *Brain Research*. **1017**:98-107.

Anisimova NY, Kiselevsky MV, Sosnov AV. 2011 Trans-, cis-, and dihydro-resveratrol: a comparative study. *Chemistry Central Journal*.**5**: 88.

Carrasco-Pozo C, Morales P, Gotteland M. 2013. Polyphenols protect the epithelial barrier function of Caco-2 cells exposed to indomethacin through the modulation of occludin and zonula occludens-1 expression. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **61**: 5291-5297.

de Bruijn, W J C, Araya-Cloutier C, Bijlsma J, de Swart A, Sanders MG, de Waard P, Vincken JP. 2018. Antibacterial prenylated stilbenoids from peanut (*Arachis hypogaea*). *Phytochemistry Letters*. **28**:13-18

Denker BM, Sabath E. 2011. The biology of epithelial cell tight junctions in the kidney. *Journal of the American Society of Nephrology*. **22**: 622–625.

Dong Y, Hou Q, Lei J, Wolf PG, Ayansola H, Zhang B. 2020. Quercetin Alleviates Intestinal Oxidative Damage Induced by H₂O₂ via Modulation of GSH: In Vitro Screening and in Vivo Evaluation in a Colitis Model of Mice. *ACS Omega*. **5**: 8334-8346.

Dvorakova M, Landa P. 2018. Anti-inflammatory activity of natural stilbenoids: A review. *Pharmacological Research*, **124**: 126-145.

Fogh J, Wright JC, Loveless JD. 1977. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumours. *Journal of the National Cancer Institute Inst* **21**:393–408.

Frémont L. 2000. Minireview: Biological effects of resveratrol. *Life Sciences*. **66**: 663-673.

Friedecký D, Lemr K. 2012. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická Biochemie a Metabolismus*. **20**:152–157.

Gakh AA, Anisimova NY, Kiselevsky MV, Sadovnikov SV, Stankov IN, Yudin MV, Rufanov KA, Krasavin MY, Sosnov AV. 2010. Dihydro-resveratrol-A potent dietary polyphenol. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **20**: 6149-6151.

- Goldberg DM, Yan J, Soleas GJ. 2003. Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Clinical Biochemistry*. **36**: 79–87.
- Goodacre R, Vaidyanathan S, Dunn WB, Harrigan GG, Kell DB. 2004. Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends in Biotechnology*. **22**: 245
- Guilhaus M, Mlynski V, Selby D. 1997. Perfect Timing: Time-of-flight Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **11**: 951-962
- Hoarau C, Pettus TRR. 2003. Strategies for the preparation of differentially protected ortho-prenylated phenols. *Synlett*. **1**: 127-137
- Chao J, Yu MS, Ho YS, Wang M, Chang RCC. 2008. Dietary oxyresveratrol prevents parkinsonian mimetic 6-hydroxydopamine neurotoxicity. *Free Radical Biology and Medicine*. **45**: 1019-1026.
- Charu G, Girish S, Chan D. 2014. Resveratrol: a chemo-preventative agent with diverse applications. *Phytochemicals of nutraceutical importance*. Amity Institute for Herbal Research & Studies, Amity University Uttar Pradesh. India. ISBN: 9781780643632
- Chen M, Yi L, Jin X, Xie Q, Zhang T, Zhou X, Chang H, Fu Y, Zhu J, Zhang Q. 2013. Absorption of resveratrol by vascular endothelial cells through passive diffusion and an SGLT1-mediated pathway. *Journal of Nutrition and Biochemistry*, **24**: 1823–1829.
- Cheng KC, Li C, Uss AS. 2008. Prediction of oral drug absorption in humans from cultured cell lines and experimental animals. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. **4**: 581–590.
- Intagliata S, Modica MN, Santagati LM, Montenegro L. 2019. Strategies to Improve Resveratrol Systemic and Topical Bioavailability: An Update. *Antioxidants*, **8**: 244.
- Ishihata A, Maruki-Uchida H, Gotoh N, Kanno S, Aso Y, Togashi S, Sai M, Ito T, Katano Y. 2016. Vascular- and hepato-protective effects of passion fruit seed extract containing piceatannol in chronic high-fat diet-fed rats. *Food and Function*. **7**: 4075-4081.
- Jarosova V, Vesely O, Dosekocil I, Tomisova K, Marsik P, Jaimes JD, Havlik J. 2020. Metabolism of cis- and trans-resveratrol and dihydroresveratrol in an intestinal epithelial model. *Nutrients*. **12**: 595.
- Junsaeng D, Anukunwithaya T, Songvut P, Sritularak B, Likhitwitayawuid K, Khemawoot P. 2019. Comparative pharmacokinetics of oxyresveratrol alone and in combination with piperine as a bioenhancer in rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. **19**: 235.

Karabín M, Hudcová T, Jelínek L, Dostálek P. 2012. The Importance of Hop Prenylflavonoids for Human Health. *Chemické Listy*. **106**: 1095-1103.

Kim S, Ahn J, Shon DW, Kim JS, Kim MH, Ha TY. 2008. Comparison of the permeability of stilbene analogues in caco-2 cells. *Food Science and Biotechnology*, **17**: 675-678.

Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P. 2006. Resveratrol Improves Mitochondrial Function and Protects against Metabolic Disease by Activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell*, **127**: 1109–1122.

Lea T. 2015. Caco-2 cell line. In *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models*. Cham. ISBN: 978-3-319-16104-4.

Leláková V, Béraud-Dufour S, Hošek J, Šmejkal K, Prachyawarakorn V, Pailee P, Heurteaux C. 2020. Therapeutic potential of prenylated stilbenoid macasiamenene F through its anti-inflammatory and cytoprotective effects on LPS-challenged monocytes and microglia. *Journal of Ethnopharmacology*. **263**

Ling K, Wan MLYW, El-Nezami H, Wang M. 2016. Protective capacity of resveratrol, a natural polyphenolic compound, againsts deoxynivalenol-induced intestinal barrier dysfunction and bacterial translocation. *Chemical Research in Toxicology*. **29**: 823.

Lu DL, Ding DJ; Yan WJ, Li RR, Dai F, Wang Q, Yu SS, Li Y, Jin XL, Zhou B. 2013. Influence of glucuronidation and reduction modifications of resveratrol on its biological activities. *ChemBioChem*. **14**:1094–1104

Maneechai S, Likhitwitayawuid K, Sritularak B, Palanuvej C, Ruangrunsi N, SirisaArd P. 2009. Quantitative analysis of oxyresveratrol content in *Artocarpus lakoocha* and 'Puag-Haad'. *Medical Principles and Practice*. **18**: 223-227.

Mueller SO, Simon S, Chae K, Metzler M, Korach KS. 2004. Phytoestrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor alpha (ERalpha) and ERbeta in human cells. *Toxicological Sciences*. **80**: 14-25.

Murata M, Midorikawa K, Koh M, Umezawa K, Kawanishi S. 2004. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *Biochemistry*. **43**: 270-282.

Musilová J, Glatz Z. 2011. *Metabolomika – základní pojmy, strategie a metodologie*. Chemické listy. **105**: 745-751

Nováková L, Douša M. 2013. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha. ISBN 978-80-260-4243-3

- Piotrowska H, Kucinska M, Murias M. 2012. Biological activity of piceatannol: leaving the shadow of resveratrol. *Mutation Research*. **750**: 60-82.
- Poulose SM, Thangthaeng N, Miller MG, Shukitt-Hale B. 2015. Effects of pterostilbene and resveratrol on brain and behavior. *Neurochemistry International*. **89**: 227-233.
- Prusová N, Kollár P. 2019. Prenylated phenols with cytotoxic and antiproliferative activity isolated from *Morus alba*. *Česká a slovenská farmacie*. **68**: 48–68.
- Radapong S, Sarker SD, Ritchie KJ. 2020. Oxyresveratrol Possesses DNA Damaging Activity. *Molecules*. **25**: 2577.
- Radko Y, Christensen KB, Christensen LP. 2013. Semi-preparative isolation of dihydroresveratrol-3-O- β -d-glucuronide and four resveratrol conjugates from human urine after oral intake of a resveratrol-containing dietary supplement. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **930**: 54-61.
- Rao M, Gershon MD. 2016. The bowel and beyond: The enteric nervous system in neurological disorders. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. **13**: 517–528.
- Riccio BVF, Fonseca-Santos B, Ferrari PC, Chorilli M. 2019. Characteristics, Biological Properties and Analytical Methods of Trans-Resveratrol: A Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. **50**: 339-358.
- Rivière C, Pawlus AD, Mérillon JM. 2012. Natural stilbenoids: Distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in Vitaceae. *Natural Product Reports*. **29**: 1317-1333
- Sheth P, Samak G, Shull JA, Seth A, Rao R. 2009. Proteinphosphatase 2A plays a role in hydrogen peroxide-induced disruption of tight junctions in Caco-2 cell monolayers. *Biochemical Journal*, **421**: 59–70.
- Smith CA, Want EJ, O’Maille G, Abagyan R, Siuzdak, G. 2006. XCMS: Processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Analytical Chemistry*. **78**: 779–787
- Sonia K, Shree BB, Lakshmi KSL. 2017. HPTLC Method Development and Validation: An Overview. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **9**: 652–657.
- Suzuki T. 2013. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **70**: 631–659.
- Szaefer H, Cichocki M, Krajka-Kuźniak V, Stefański T, Sobiak S, Licznarska B, Baer-Dubowska W. 2014. The effect of resveratrol and its methylthio-derivatives on NF- κ B and AP-1 signaling pathways in HaCaT keratinocytes. *Pharmacological Reports*. **66**: 732-740.

Timmers S, Konings E, Bilet L, Houtkooper RH, van de Weijer T, Goossens GH, Hoeks J, van der Krieken S, Ryu D, Kersten S. 2011. Calorie Restriction-like Effects of 30 Days of Resveratrol Supplementation on Energy Metabolism and Metabolic Profile in Obese Humans. *Cell Metabolism*. **14**: 612– 622.

Villas-Bôas SG, Roessner U, Hansen MAE, Smedsgaard J, Nielsen J. 2007. *Metabolome analysis: An introduction*. Wiley, New Jersey. ISBN: 978-0-471-74344-6

Vijayakumar MR, Kumari L, Patel KK, Vuddanda PR, Vajanthri KY, Mahto SK, Singh S. 2016. Intravenous administration of: Trans -resveratrol-loaded TPGS-coated solid lipid nanoparticles for prolonged systemic circulation, passive brain targeting and improved in vitro cytotoxicity against C6 glioma cell lines. *RSC Advances*. **6**: 50336-50348.

Walle T. 2011. Bioavailability of resveratrol. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **1215**: 9-15

Westphal CS, McLean JA, Acon BW, Allen LA, Montaser A. 2002. Axial Inductively Coupled Plasma TOF-MS Using Direct Liquid Sample Introduction. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. **17**: 669-675.

Xu MJ, Wu B, Ding T, Chu JH, Li CY, Zhang J, Li, P. 2012. Simultaneous characterization of prenylated flavonoids and isoflavonoids in *Psoralea corylifolia* L. by liquid chromatography with diode-array detection and quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **26**: 2343-2358

Yang X, Jiang Y, Yang J, He J, Sun J, Chen F, Yang B. 2015. Prenylated flavonoids, promising nutraceuticals with impressive biological activities. *Trends in Food Science and Technology*. **44**: 93-104.

Yu CW, Shin YG, Chow A, Li YM, Kosmeder JW, Lee, YS, Hirschelman WH, Pezzuto JM, Mehta RG, van Breemen RB. 2002. Human, rat, and mouse metabolism of resveratrol. *Pharmaceutical Research*. **19**: 1907-1914.

Zykova TA, Zhu F, Zhai X, Ma WY, Ermakova SP, Ki WL, Bode AM, Dong Z. 2008. Resveratrol directly targets COX-2 to inhibit carcinogenesis. *Molecular Carcinogenesis*. **47**: 798-805.

10 Seznam použitých zkratek a symbolů

5-LOX – 5 – lipooxygenáza
AP-1 – Activator protein 1
BV-2 – typ makrogljové buňky
Cisres - cisresveratrol
COX-1 - cyklooxygenáza
COX-2 - cyklooxygenáza 2
Dhres - dihydroresveratrol
IB - kináza
IKK - kinázový komplex
MCF-7 - linie buněk izolované z rakoviny prsu
MD2 - CD14 - lidské embryonální buňky odvozené z ledvinových buněk
NF-kB - nukleární faktor kappa B
Q-TOF - kvadrupól kombinovaný s analyzátozem doby letu
RNS - reactive nitrogen specie = reaktivní formy dusíku
ROS - reactive oxygen species = reaktivní formy kyslíku
SIRT1 - sirtuin
TEER - transepitelární elektrický odpor
THP-1 - monocytární buněčná linie
THP-1-XBlue™ - konkrétní typ monocytární buněčné linie
TJ - těsný spoj
t-res - trans-resveratrol
UPLC - ultra účinná kapalinová chromatografie

11 Seznam obrázků a tabulek

Obrázek 1: molekula trans-resveratrolu a cis-resveratrolu

Obrázek 2: molekula dihydroresveratrolu

Obrázek 3: molekula oxyresveratrolu

Obrázek 4: růst tkáňových monovrstev

Obrázek 5: schéma Q-TOF

Obrázek 6: Caco-2 linie buněk

Obrázek 7: strukturální vzorce prenylovaných stilbenoidů a jejich technické názvy

Obrázek 8 : Molekulová hmotnost MS1

Obrázek 9: molekulová hmotnost N4

Obrázek 10: molekulová hmotnost N1, N2, N5, N6

Obrázek 11: krabicový graf látky MS1

Obrázek 12: krabicový graf látky N1

Obrázek 13: krabicový graf látky N2

Obrázek 14: krabicový graf látky N4

Obrázek 15: krabicový graf látky N5

Obrázek 16: krabicový graf látky N6

Obrázek 17: tvorba hydroxylových metabolitů vybraných sloučenin

Obrázek 18: tvorba glukoronidových metabolitů vybraných stilbenoidů

Obrázek 20: zobrazení MS1 ve hmotnostním spektru

Obrázek 21: zobrazení N1,N2,N5,N6 ve hmotnostním spektru

Obrázek 22: zobrazení N4 ve hmotnostním spektru

Tabulka 1: obsah resveratrolu ve vybraných potravinách

Tabulka 2: průběh gradientové eluce

Tabulka 3: seznam pozorovaných stilbenoidů a jejich přesná specifikace

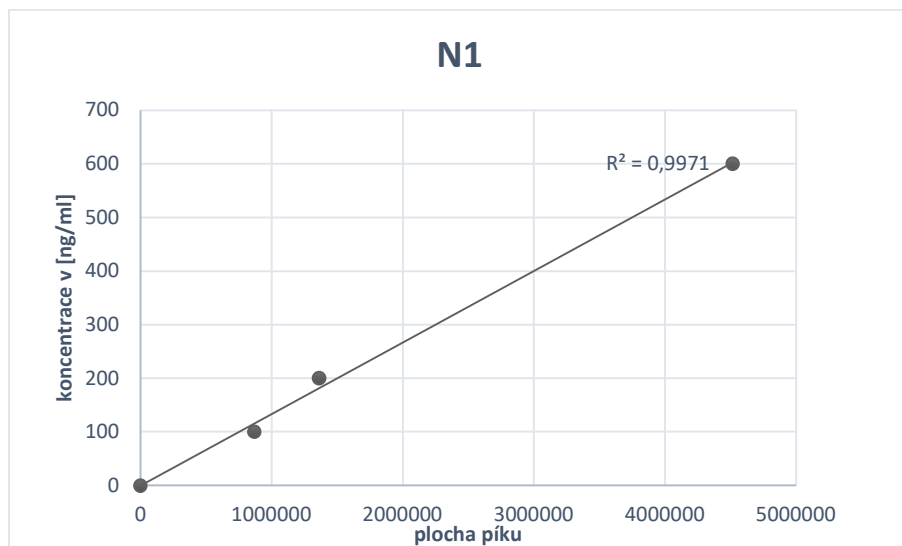
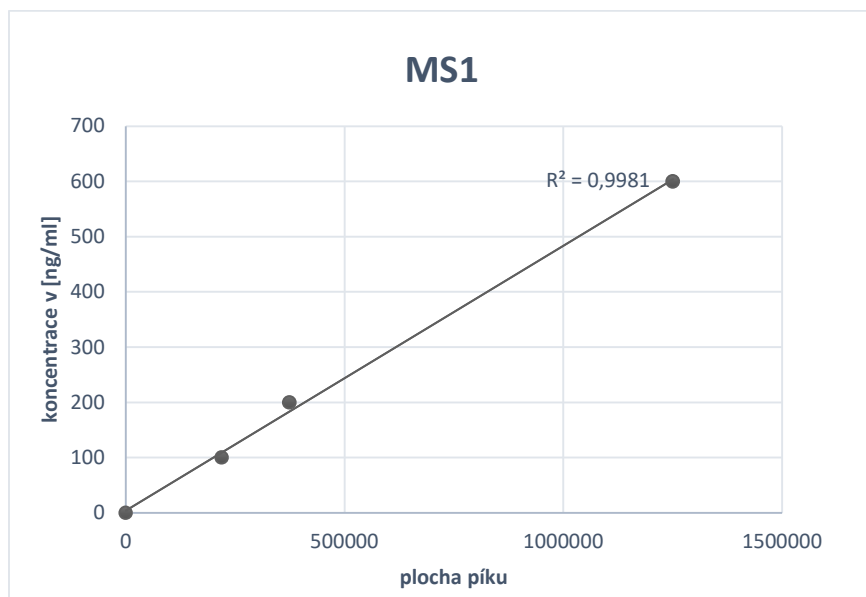
Tabulka 4: rovnice kalibračních křivek vybraných prenylovaných sloučenin.

Tabulka 5: strategie porovnání dat

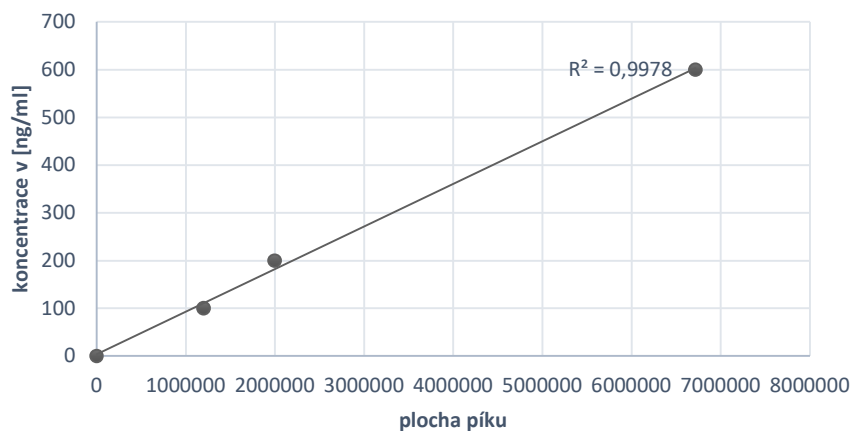
12 Seznam příloh

12.1 Grafické znázornění kalibračních křivek vybraných sloučenin prenylovaných stilbenoidů

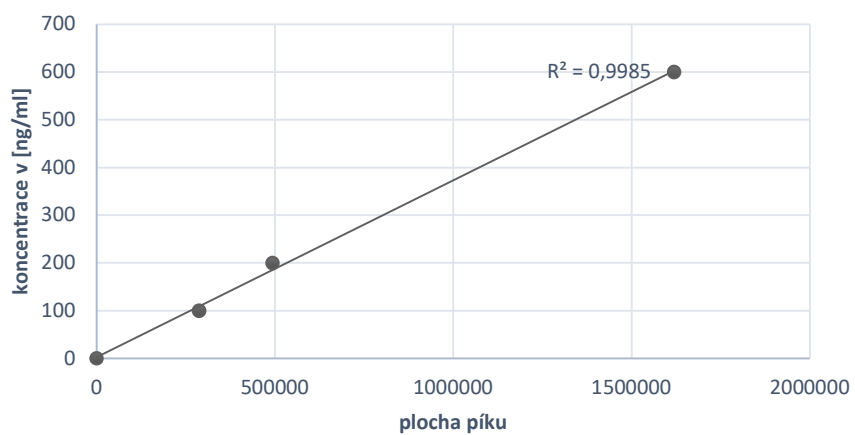
12.2 Tabulky znázorňující významné hmoty nalezené v XCMS při porovnání mezi vybranými skupinami



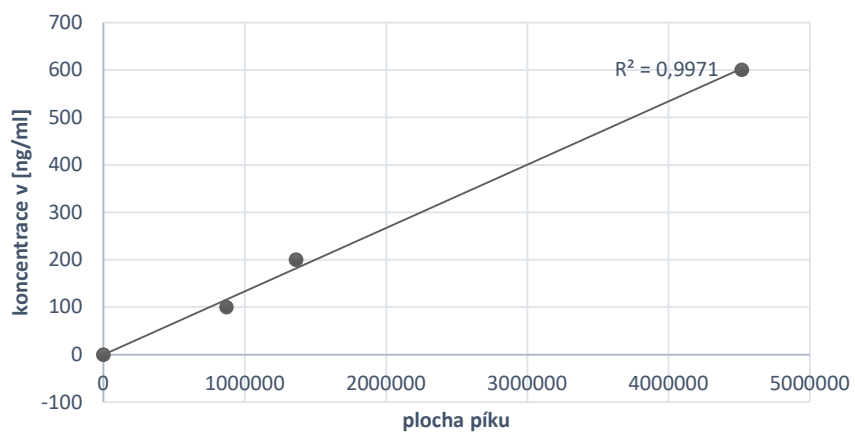
N2

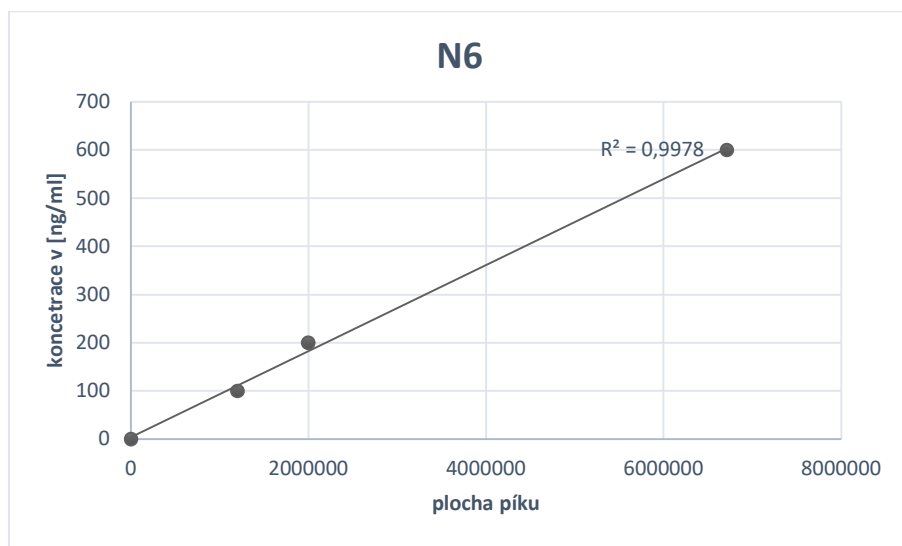


N4



N5





Příloha 1. Grafické znázornění kalibračních křivek vybraných sloučenin prenylovaných stilbenoidů

MS1_4h_N1_0h	mzmed	rtmed
MS1_4h_N1_0h	155,0012	18,46089
MS1_4h_N1_0h	185,0106	18,49605
MS1_4h_N1_0h	236,1482	6,387383
MS1_4h_N1_0h	274,2724	8,355833
MS1_4h_N1_0h	316,2096	4,142633
MS1_4h_N1_0h	387,1902	9,6906
MS1_4h_N1_0h	389,2662	9,742633
MS1_4h_N1_0h	406,2925	9,742633
MS1_4h_N1_0h	425,2628	10,40123
MS1_4h_N1_0h	430,2402	5,07895
MS1_4h_N1_0h	431,7759	10,67852
MS1_4h_N1_0h	440,4065	9,846683
MS1_4h_N1_0h	532,3803	10,69585
MS1_4h_N1_0h	537,3358	10,69585
MS1_4h_N1_0h	576,406	10,69585
MS1_4h_N1_0h	581,3612	10,69585
MS1_4h_N1_0h	620,4318	10,69585
MS1_4h_N1_0h	625,387	10,69585
MS1_4h_N1_0h	637,3002	11,05264
MS1_4h_N1_0h	638,3037	11,0598
MS1_4h_N1_0h	639,3069	11,0598
MS1_4h_N1_0h	654,3264	11,0598
MS1_4h_N1_0h	655,3292	11,0598

MS1_4h_N1_0h	656,8054	11,0598
MS1_4h_N1_0h	659,2818	11,0598
MS1_4h_N1_0h	659,7849	11,0598
MS1_4h_N1_0h	660,2852	11,0598
MS1_4h_N1_0h	664,4569	10,67852
MS1_4h_N1_0h	665,4603	10,69585
MS1_4h_N1_0h	696,3725	11,0598
MS1_4h_N1_0h	696,388	11,07478
MS1_4h_N1_0h	697,3759	11,0598
MS1_4h_N1_0h	708,4824	10,67852
MS1_4h_N1_0h	727,2681	11,0598
MS1_4h_N1_0h	739,2242	11,0598
MS1_4h_N1_0h	740,2283	11,0598
MS1_4h_N1_0h	840,5593	10,67852
MS1_4h_N1_0h	975,4525	11,0598
MS1_4h_N1_0h	977,4275	11,0598
MS1_4h_N1_0h	977,9312	11,0598
MS1_4h_N1_0h	978,432	11,0598

MS1_MET_N2_0h	mzmed	rtmed
MS1_MET_N2_0h	274,2737944	8,268767
MS1_MET_N2_0h	275,2772784	8,268767
MS1_MET_N2_0h	374,362283	9,440642
MS1_MET_N2_0h	424,4864371	10,46377
MS1_MET_N2_0h	425,4898562	10,46377
MS1_MET_N2_0h	426,4932544	10,46377
MS1_MET_N2_0h	480,5492072	10,69908
MS1_MET_N2_0h	481,5526063	10,70406
MS1_MET_N2_0h	592,6737419	11,09035
MS1_MET_N2_0h	593,6770027	11,09035
MS1_MET_N2_0h	594,6810643	11,09898

N1_4h_MS1_0h	mzmed	rtmed
N1_4h_MS1_0h	403,3634	9,55
N1_4h_MS1_0h	637,303	11,05288
N1_4h_MS1_0h	659,2834	11,04788
N1_4h_MS1_0h	660,287	11,04788
N1_4h_MS1_0h	728,273	11,01
N1_4h_MS1_0h	611.1907	10.3494
N1_4h_MS1_0h	675.2567	11.0478

N1_MET_N4_0h	mzmed	rtmed
N1_MET_N4_0h	272,293	8,42
N1_MET_N4_0h	289,6356	11,18369
N1_MET_N4_0h	353,3511	11,69562
N1_MET_N4_0h	400,34	9,8500
N1_MET_N4_0h	544,3348	11,32834
N1_MET_N4_0h	891,355	10,41

N2_4h_N4_0h	m/z	RT
N2_4h_N4_0h	87,02797	18,41078
N2_4h_N4_0h	111,0207	18,43467
N2_4h_N4_0h	145,064	10,99018
N2_4h_N4_0h	239,1051	3,032583
N2_4h_N4_0h	241,1016	3,344467
N2_4h_N4_0h	354,2677	11,6426
N2_4h_N4_0h	629,1333	9,079292

N2_MET_MS1_0h	mzmed	rtmed
N2_MET_MS1_0h	170,9599	7,667167
N2_MET_MS1_0h	242,218	10,73098
N2_MET_MS1_0h	243,2492	11,12462
N2_MET_MS1_0h	348,2745	11,48848
N2_MET_MS1_0h	525,8801	11,60671
N2_MET_MS1_0h	532,3239	11,14723
N2_MET_MS1_0h	543,322	11,07593
N2_MET_MS1_0h	546,4798	14,79377
N2_MET_MS1_0h	621,601	12,82868
N2_MET_MS1_0h	711,4747	14,11932
N2_MET_MS1_0h	752,5189	11,27125
N2_MET_MS1_0h	785,0254	7,251217
N2_MET_MS1_0h	1062,15	11,30322

N4_4h_N6_0h	mzmed	rtmed
N4_4h_N6_0h	166,057	9,297933
N4_4h_N6_0h	178,0572	8,545675
N4_4h_N6_0h	187,0563	12,68937
N4_4h_N6_0h	187,1431	13,63823
N4_4h_N6_0h	278,1303	7,597392
N4_4h_N6_0h	511,5885	18,43488

N4_MET_N5_0h	mzmed	rtmed
N4_MET_N5_0h	315,0818	7,58385
N4_MET_N5_0h	467,1644	8,546225
N4_MET_N5_0h	487,9008	11,93685
N4_MET_N5_0h	698,3793	14,99518
N4_MET_N5_0h	724,8702	15,67131
N4_MET_N5_0h	727,8691	18,11483
N4_MET_N5_0h	767,8109	18,35782

N4_MET_N5_0h	mzmed	rtmed
N4_MET_N5_0h	315,0818	7,58385
N4_MET_N5_0h	467,1644	8,546225
N4_MET_N5_0h	487,9008	11,93685
N4_MET_N5_0h	698,3793	14,99518
N4_MET_N5_0h	724,8702	15,67131
N4_MET_N5_0h	727,8691	18,11483
N4_MET_N5_0h	767,8109	18,35782

N5_4h_MS1_0h	mzmed	rtmed
N5_4h_MS1_0h	134,0441	22,9138
N5_4h_MS1_0h	145,0854	4,8846
N5_4h_MS1_0h	323,295	11,0100
N5_4h_MS1_0h	637,3017	11,04738
N5_4h_MS1_0h	659,2834	11,04738
N5_4h_MS1_0h	744,5484	12,42967

N5_MET_N4_0h	mzmed	rtmed
N5_MET_N4_0h	424,4852	10,41894
N5_MET_N4_0h	425,4885	10,41894
N5_MET_N4_0h	438,2957	11,47213
N5_MET_N4_0h	516,3033	10,85599
N5_MET_N4_0h	532,3317	11,54057
N5_MET_N4_0h	592,6723	11,10164
N5_MET_N4_0h	734,5542	15,35108
N5_MET_N4_0h	741,5539	16,26577
N5_MET_N4_0h	760,5816	16,63916
N5_MET_N4_0h	782,559	16,95453
N5_MET_N4_0h	782,5635	16,60018

N6_4h_N4_0h	mzmed	rtmed
N6_MET_N4_0h	388,3546	13,66097
N6_MET_N4_0h	422,2994	11,8128
N6_MET_N4_0h	283,068	17,10186
N6_MET_N4_0h	422,2926	11,1947
N6_MET_N4_0h	283,0681	15,25572
N6_MET_N4_0h	360,322	12,8
N6_MET_N4_0h	540,138	13,75

N6_MET_MS1_0h	mzmed	rtmed
N6_MET_MS1_0h	395,1583	10,11497
N6_MET_MS1_0h	425,4887	10,42922
N6_MET_MS1_0h	544,3342	11,33664
N6_MET_MS1_0h	395,2177	10,12348
N6_MET_MS1_0h	496,3369	11,25031
N6_MET_MS1_0h	518,3188	11,25031

Příloha 2.Tabulky znázorňující významné hmoty nalezené v XCMS při porovnání mezi
vybranými skupinami