

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra kvality a bezpečnosti potravin**



**Česká zemědělská  
univerzita v Praze**

**Vliv resveratrolu na metabolom stolice**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Lucie Nová**

**Obor studia: Kvalita potravin a zpracování zemědělských  
produktů**

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

**Konzultant: Ing. Kateřina Tomisová**

© 2022 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv resveratrolu na metabolismus stolice" 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 14.4.2022

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala zejména Ing. Veronice Jarošové, Ph.D. a Ing. Kateřině Tomisové za jejich čas, trpělivost, odborné rady, pomoc při práci v laboratoři a velmi přátelský přístup během vedení této diplomové práce. Nakonec patří poděkování mé rodině a příteli, kteří mě po celý čas studia podporovali a dodávali odvahu.

# Vliv resveratrolu na metabolom stolice

## Souhrn

Resveratrol je sekundární metabolit některých druhů rostlin a řadí se mezi nejvýznamnější zástupce stilbenoidů. Jedná se o chemickou látku, která má nízkou biodostupnost a podléhá rychlému metabolismu v játrech a střevech. Především v tlustém střevě dochází k oboustranné interakci mezi resveratrolem a střevní mikrobiotou. Tato vzájemná komunikace výrazně ovlivňuje metabolismus resveratrolu, složení střevního metabolomu i složení samotného mikrobiomu. Resveratrol má mnoho pozitivních účinků na lidský organismus. Známá je zejména ochrana proti kardiovaskulárním chorobám, ale také antioxidační, protizánětlivá a další zdravotně prospěšné vlastnosti.

Praktická část diplomové práce byla zaměřena na výzkum mikrobiálního metabolismu resveratrolu a jeho vlivu na střevní metabolom v *in vitro* fekálním fermentačním systému. Jako inokulum byly využity čerstvé vzorky stolice od 20 různých dárců. V pěti časových bodech 0, 2, 4, 8 a 24 hodin byly z fermentačního systému odebírány vzorky pro měření. Vzorky byly podrobeny NMR analýze a UHPLC/Q-TOF analýze. Získaná data byla následně analyzována pomocí výstupních programů (Chenomx 8.5, XCMS), a nakonec statisticky vyhodnocena v Microsoft Excel a IBM SPSS Statistics 28. Cílem praktické části bylo stanovit hlavní katabolity resveratrolu v modelu tlustého střeva a vyhodnotit, jakým způsobem přidávek resveratrolu ovlivnil metabolom stolice.

Výsledky z této studie ukazují, že resveratrol byl metabolicky transformován střevní mikrobiotou. Identifikovány byly dva hlavní metabolity resveratrolu, a to dihydroresveratrol a lunularin. Nicméně lunularin byl na rozdíl od dihydroresveratrolu detekován pouze pomocí kapalinové chromatografie. Dihydroresveratrol vznikal u všech dárců, ale byly zjištěny velké interindividuální rozdíly v jeho produkci. Naopak lunularin byl nalezen pouze u devíti dárců s převahou producentů s věkem do 45 let (6 dárců). Dále bylo zjištěno, že po přidání resveratrolu došlo ke snížení koncentrace mastných kyselin s krátkým uhlíkatým řetězcem a ke zvýšení koncentrace glukózy a trehalózy v čase. V ošetřených variantách byly pozorovány také rozdíly v produkci acetátu, izobutyryátu a glukózy mezi věkovými skupinami.

**Klíčová slova:** kapalinová chromatografie, metabolomika, mikrobiota, NMR, resveratrol

# The effect of resveratrol on faecal metabolome

## Summary

Resveratrol is a secondary metabolite of some plant species and one of the most important representatives of stilbenoids. It is a chemical compound that has low bioavailability and rapid metabolism in the liver and intestine. Especially in the colon, there is a bilateral interaction between the resveratrol and the gut microbiota. This interaction significantly affects the metabolism of resveratrol, the composition of the intestinal metabolome and the composition of the microbiome itself. Resveratrol has many positive effects on the human organism. It is known for protection against cardiovascular disease, but also for antioxidant, anti-inflammatory and other health benefits.

The practical part of this thesis was focused on the research of microbial metabolism of resveratrol and its effect on the intestinal metabolism in the *in vitro* faecal fermentation system. Fresh stool samples from 20 different donors were used as inoculum. At five time points 0, 2, 4, 8 and 24 hours, samples were taken from the fermentation system for measurement. The samples were subjected to NMR analysis and UHPLC/Q-TOF analysis. The obtained data were subsequently analysed using output programs (Chenomx 8.5, XCMS), and finally statistically evaluated in Microsoft Excel and IBM SPSS Statistics 28. The aim of the practical part was to determine the main catabolites of resveratrol in the colon model and evaluate how the addition of resveratrol affected the stool metabolome.

The results of this study show that resveratrol was metabolically transformed by gut microbiota. Two major metabolites of resveratrol have been identified, dihydroresveratrol and lunularin. However, unlike dihydroresveratrol, lunularin was detected only by liquid chromatography. Dihydroresveratrol was produced by all donors, but large interindividual differences in its production were found. In contrast, lunularin was found in only nine donors with a predominance of producers under the age of 45 (6 donors). Furthermore, the addition of resveratrol was found to reduce the concentration of short carbon chain fatty acids and increase the concentration of glucose and trehalose over time. Differences in the production of acetate, isobutyrate and glucose among age groups were also observed in the treated variants.

**Keywords:** liquid chromatography, metabolomics, microbiota, NMR, resveratrol

# Obsah

1	Úvod .....	8
2	Vědecká hypotéza a cíle práce .....	9
3	Literární rešerše .....	10
3.1	Střevní mikrobiota .....	10
3.2	Stilbenoidy .....	12
3.2.1	Resveratrol .....	13
3.3	Metabolomika .....	15
3.4	Metabolismus resveratrolu .....	17
3.5	Interakce mezi resveratrolem a mikrobiotou .....	19
3.6	Zdravotní účinky resveratrolu .....	21
3.6.1	Efekt resveratrolu na kardiovaskulární choroby .....	22
3.6.2	Efekt resveratrolu na diabetes mellitus .....	23
3.6.3	Efekt resveratrolu na neurologická onemocnění .....	24
3.6.4	Efekt resveratrolu na nádorová onemocnění .....	25
3.7	Nukleární magnetická rezonance .....	26
4	Metodika .....	28
4.1	<i>In vitro</i> fekální fermentační systém .....	28
4.1.1	Chemikálie .....	28
4.1.2	Fermentační médium .....	28
4.1.3	Fosfátový pufr, redukční roztok .....	28
4.1.4	Odběr a příprava vzorků stolice .....	28
4.1.5	Příprava 96-jamkových deep-well destiček .....	29
4.1.6	Příprava roztoku resveratrolu .....	29
4.1.7	Proces fermentace .....	29
4.1.8	Příprava vzorků pro NMR analýzu .....	30
4.1.9	Příprava vzorků pro UHPLC/Q-TOF analýzu .....	30
4.1.10	NMR analýza .....	30
4.1.11	UHPLC/Q-TOF analýza .....	30
4.1.12	Statistická analýza .....	31
5	Výsledky .....	32
5.1	Analýza metodou UHPLC/Q-TOF .....	32
5.1.1	Metabolismus resveratrolu .....	32
5.2	Analýza metodou NMR .....	34
5.2.1	Metabolismus resveratrolu .....	34
5.2.2	Metabolom tlustého střeva .....	35
6	Diskuze .....	37

<b>7 Závěr.....</b>	<b>41</b>
<b>8 Literatura.....</b>	<b>42</b>
<b>9 Seznam použitých zkratek.....</b>	<b>50</b>
<b>10 Samostatné přílohy .....</b>	<b>I</b>

# 1 Úvod

Předmětem této práce je výzkum metabolismu resveratrolu v *in vitro* modelu tlustého střeva a dále jeho vliv na složení střevního metabolomu. Resveratrol je přírodní chemická látka, jejíž vznik je odvozen od šikimátové dráhy v rostlinách. Vysoký obsah resveratrolu byl nalezen v křídlatce japonské (*Polygonum cuspidatum*), révě vinné (*Vitis vinifera*), ale také v plodech podzemnice olejné (*Arachis hypogaea*) (Riccio et al. 2020). Resveratrol patří mezi nejvýznamnější zástupce stilbenů, které spadají do velké skupiny polyfenolů. Předpokládá se, že stilbeny mohou sloužit jako prevence proti některým chronickým onemocněním, jako jsou kardiovaskulární choroby, neurodegenerativní onemocnění a další (Dvorakova & Landa 2017). Z řady studií vyplývá, že resveratrol má několik pozitivních biologických vlastností. Příkladem zdravotně prospěšných vlastností pro člověka může být kardioprotektivní, antioxidační, antimikrobiální, neuroprotektivní, protizánětlivá a aktivita (Poulose et al. 2015).

Stilbenoidy mají velmi nízkou biodostupnost, která je z velké části způsobena jejich rychlým metabolismem v játrech a ve střevech. Resveratrol nejvíce podléhá metabolismu v tlustém střevě, a to za účasti střevní mikrobioty, která ovlivňuje vznik metabolitů. Z důvodu rozdílného složení střevní mikrobioty probíhá metabolismus u každého jedince jinak (Bode et al. 2013). Složení střevní mikrobioty se vyvíjí celý život a je závislé na mnoha faktorech. Jedním z faktorů, který má vliv na diverzitu střevních mikroorganismů je způsob porodu. Ve studiích byl zjištěn významný rozdíl v druhovém zastoupení bakterií mezi dětmi, které byly přivedeny na svět porodními cestami a cisařským řezem (Lynch & Pedersen 2016). Na formování mikrobioty v brzkém věku se výrazně podílí také kojení a specifické složení mateřského mléka. V neposlední řadě hraje významnou roli strava a věk jedince. Střevní mikrobiom je v dospělosti relativně stabilní, nicméně stárnutím dochází k narušení jeho stability i funkce (Lynch & Pedersen 2016; Rinninella et al. 2019).

Osud resveratrolu v trávicím traktu a jeho vliv na mikrobiotu jsou předmětem mnoha *in vitro* i *in vivo* studií. V doposud provedených studiích byly nalezeny 3 hlavní metabolity resveratrolu: dihydroresveratrol, *trans*-3,4'-dihydroxystilben a lunularin. Nově vzniklým katabolitům se věnuje zvýšená pozornost, jelikož jsou považovány za biologicky významnější formy s možnými fyziologickými účinky (Jung et al. 2009; Bode et al. 2013; Jarosova et al. 2019). Předmětem výzkumů je také schopnost resveratrolu měnit průběh metabolických drah, což způsobuje změnu v metabolomu moči a stolice (Torres Santiago et al. 2019).

Charakterizací a identifikací metabolomu se zabývá vědní disciplína zvaná metabolomika, jejíž význam v posledních letech výrazně roste (Pinu et al. 2019). V současné době jsou v metabolomice nejvíce využívány analytické metody, jako je nukleární magnetická rezonance (NMR) a hmotnostní spektrometrie ve spojení s chromatografií (plynovou, kapalinovou) nebo elektroforetickou separací (Dunn et al. 2011). Je zapotřebí brát v potaz, že každá metoda má své pro a proti. Například NMR je spolehlivější pro stanovení koncentrací a má vyšší reprodukovatelnost, naopak hmotnostní spektrometrie je citlivější (Jin et al. 2019). I přesto, že metabolomika je mladá vědní disciplína, tak je zřejmé, že nám v budoucnu může pomoci k hlubšímu pochopení některých mechanismů. Kupříkladu znalosti z oblasti metabolomiky mohou mít významný dopad na prosazování personalizovaných terapeutických přístupů k prevenci a léčbě chronických onemocnění, ale mohou být využity i v jiných odvětvích než pouze ve zdravotnictví (například v potravinářství) (Kim et al. 2018).



## **2 Vědecká hypotéza a cíle práce**

Cílem teoretické části diplomové práce bylo zpracování literární rešerše zaměřené na metabolomiku a osud resveratrolu v trávicím traktu člověka. Cílem praktické části bylo stanovit hlavní katabolity resveratrolu v modelu tlustého střeva s využitím stolice dárců ze dvou věkových skupin (do 45 let a nad 70 let) pomocí nukleární magnetické rezonance. Dalším cílem bylo vyhodnotit, jakým způsobem přídavek resveratrolu ovlivnil metabolom stolice.

Hypotézy:

- 1) Resveratrol je mikrobiálně transformován mikrobiotou tlustého střeva.
- 2) Přídavek resveratrolu ovlivňuje střevní metabolom.
- 3) Složení střevního metabolomu se mezi dvěma sledovanými věkovými skupinami liší.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Střevní mikrobiota

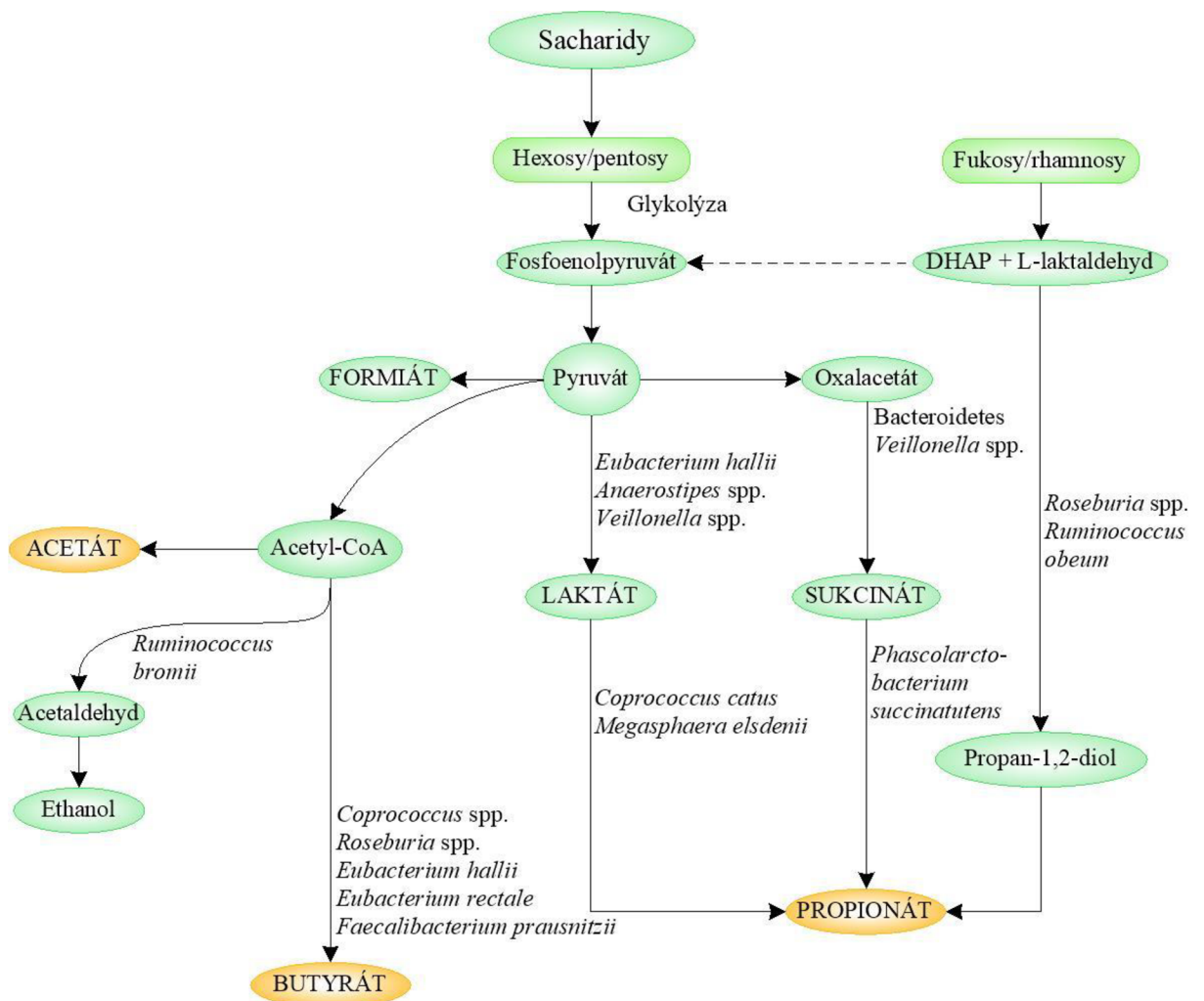
Mikroorganismy osidlující prostředí lidského střeva jsou souhrnně označovány jako střevní mikrobiota. Do této skupiny se řadí jak bakterie, tak archea, houby a viry (Fan & Pedersen 2021). Dominujícími kmeny bakterií jsou Firmicutes, Bacteroidetes a Actinobacteria. V menším množství se vyskytují bakterie z kmene Proteobacteria a Verrucomicrobia (Tuohy & Scott 2015). Většina patří mezi komenzální nebo mutualistické mikroorganismy. Složení střevní mikrobioty je u každého jedince jedinečné nejen kvůli diverzitě mikrobiálních kmenů, rozdílným rychlostem růstu a strukturálním variantám mikrobiálních genů, ale také proto, že každý hostitel má specifický genetický materiál a je vystaven rozdílným vlivům z prostředí (Fan & Pedersen 2021).

Složení střevní mikrobioty je formováno již na začátku života každého z nás ihned při porodu a vyvíjí se celý život. Předpokládá se, že rozdílné zastoupení mikroorganismů ve střevě je způsobeno typem porodu (porodními cestami, císařským řezem), ale také tím, zda je dítě kojeno či nikoliv (Lynch & Pedersen 2016). Dominguez-Bello et al. (2010) se ve své studii zabývají právě zmíněnou diverzitou střevních mikroorganismů u dětí, které byly přivedeny na svět porodními cestami a císařským řezem. Bylo zjištěno, že zatímco přirozeným porodem získávají novorozenci bakterie podobající se spíše vaginální mikrobiotě matky (*Lactobacillus* spp., *Prevotella* spp., *Sneathia* spp.), tak po porodu císařským řezem se rozvíjí především bakterie podobné těm, které se vyskytují na matčině kůži (*Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Propionibacterium* spp.) (Dominguez-Bello et al. 2010). Dalším důležitým faktorem, který působí na rozmanitost střevní mikrobioty, je již zmíněné mateřské mléko. Mateřské mléko je pro kojence velmi důležité zejména proto, že formuje střevní mikrobiotu tak, aby se co nejvíce podobala té v dospělosti (Lynch & Pedersen 2016). Mimo jiné obsahuje oligosacharidy, které mají ochranný prebiotický efekt snižující počet patogenních mikroorganismů. Laktoferin je další známou složkou mateřského mléka a přispívá k vývoji prospěšných mikroorganismů zejména u předčasně narozených dětí (Rinninella et al. 2019). Po přechodu z mléčné výživy na normální se zvyšuje diverzita mikrobioty. Během dospívání se střevní mikrobiota postupně stává více stabilní a až v dospělosti se o ní dá říci, že zůstává téměř neměnná. Avšak u starších lidí se mikrobiální počet i rozmanitost snižuje zejména v důsledku snížené imunokompetence (Lynch & Pedersen 2016).

Střevní mikrobiota se v lidském organismu účastní mnoha dějů. Podílí se na metabolismu složek potravy a na správné funkci imunitních reakcí (Patterson et al. 2014). Dále také slouží jako ochrana proti růstu patogenních mikroorganismů, syntetizuje vitamin K i některé složky vitaminů skupiny B a metabolizuje některé léky (Jandhyala 2015). Při metabolismu jednotlivých složek potravy vzniká velké množství bioaktivních látek, někdy také nazývané jako „farmabiotika“. Bioaktivní látky produkované střevní mikrobiotou, příkladem jsou mastné kyseliny s krátkým uhlíkatým řetězcem, exopolysacharidy ( $\beta$ -glukany), konjugovaná linolová kyselina a neuroprotektivní metabolity (serotonin,  $\gamma$ -aminomáselná kyselina), mohou přímo či nepřímo ovlivňovat fyziologické a metabolické procesy v lidském těle (Patterson et al. 2014). Zatímco izomery (*cis*-9, *trans*-11 a *trans*-10, *cis*-12) zmíněné konjugované linolové kyseliny jsou známy svými antidiabetickými, antiaterogenními a hypolipidemickými účinky,

masné kyseliny s krátkým uhlíkatým řetězcem hrají důležitou roli jak v prevenci a léčbě nemocí (idiopatické střevní záněty), tak v energetickém metabolismu hostitele (Patterson et al. 2014; Jandhyala 2015).

Velké rozmezí metabolických funkcí, které jsou zakódované ve střevním mikrobiomu, uděluje lidskému tělu biochemickou flexibilitu zpracovávat širokou škálu látek. Kromě metabolismu základních složek potravy (sacharidů – Obrázek č. 1, proteinů a lipidů) se v posledních letech zvýšil zájem o výzkum mikrobiálních přeměn rostlinných látek, příkladem mohou být polyfenoly (fenolové kyseliny, flavonoidy, lignany, stilbeny a třísloviny) a další fytoestrogenní látky (Rowland et al. 2018). Důvodů proč za posledních pár let narostl počet studií zabývajících se metabolismem fytoestrogenních látek existuje hned několik, ale hlavním důvodem je pravděpodobně pochopení účinků jejich metabolitů na lidské zdraví a potenciální lékařské využití (Sayed Hameed et al. 2020).



Obrázek 1 Metabolická dráha sacharidů (převzato a upraveno z Rowland et al. 2018)

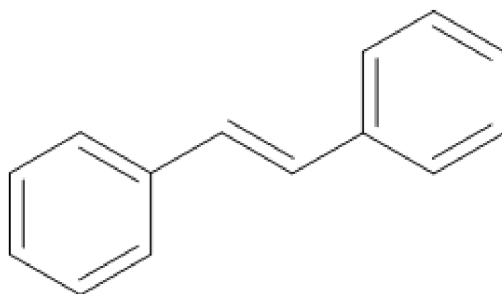
V první řadě se provádí výzkumy zaměřené na to, jak metabolismus daných látek vůbec probíhá a na jaké metabolity jsou vstupní sloučeniny střevní mikrobiotou metabolizovány, protože některé metabolity mají vyšší biologickou aktivitu a tím pádem i lepší využití než ostatní (van Duynhoven et al. 2011). Dále jsou zkoumány procesy také z druhé strany, a to jaký mají vliv rostlinné látky (především již zmíněné polyfenoly) na střevní mikrobiotu

a metabolom, jelikož se předpokládá, že existují interakce v obou směrech a vzniklé metabolity ovlivňují růst některých bakteriálních rodů (Valdés et al. 2015).

### 3.2 Stilbenoidy

Stilbenoidy jsou fenolické sekundární metabolity produkované mnoha rostlinnými druhy, mezi které patří réva vinná (*Vitis vinifera*), podzemnice olejná (*Arachis hypogaea*), čirok dvoubarevný (*Sorghum bicolor*), brusnice borůvka (*Vaccinium myrtillus*) a také některé druhy stromů (*Pinus* spp. a *Picea* spp.) (Reinisalo et al. 2015). Jejich základní chemická struktura (Obrázek č. 2) je složena ze dvou aromatických jader, která jsou spojena ethylenovým můstkem a díky němu mohou existovat ve formě *cis*- a *trans*-izomerů. Na aromatická jádra jsou dále vázány substituenty (glykosylové, hydroxylové, methylové nebo isopropylové skupiny), jež umožňují vznik rozmanitých derivátů (El Khawand et al. 2018). Doposud bylo identifikováno více než 400 látek, avšak jednou z nejznámějších je resveratrol, od kterého se mimo jiné některé další stilbenoidy odvozují (Shen et al. 2009). Do skupiny derivátů odvozených od resveratrolu patří oxyresveratrol, gnetol, piceatanol, pterostilben, rhapontigenin, pinosylvin a další (Dvorakova & Landa 2017; Akinwumi et al. 2018).

Monomery stilbenoidů mají nízkou biologickou dostupnost, což je do jisté míry způsobeno jejich rychlým metabolismem ve střevě, ale i v játrech za vzniku nových produktů (Akinwumi et al. 2018). Ve střevních epiteliálních buňkách probíhá jejich intenzivní přeměna v konjugované formy (nejčastěji *O*- $\beta$ -glukuronidy, 3-*O*-sulfáty a jejich methoxy-deriváty). Vzniklé konjugáty buď přechází skrz bazolaterální membránu nebo podléhají dalšímu katabolismu, ale tentokrát mikrobiálnímu. (Jarosova et al. 2019).



Obrázek 2 Základní struktura stilbenoidů

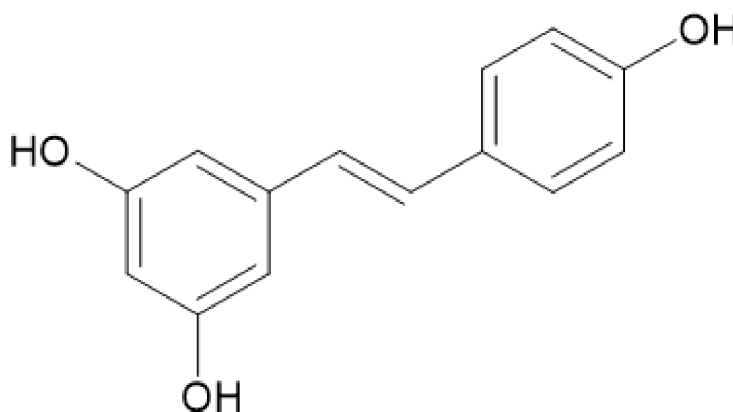
Těmto fenolickým látkám je věnována zvýšená pozornost zejména díky předpokládaným zdravotně prospěšným vlastnostem. Stilbeny jsou známy především svými antioxidačními, protizánětlivými, antikarcinogenními, antiaterogenními a neuroprotektivními účinky (Rivière et al. 2012; Krawczyk 2019). Nicméně je nutné podotknout, že stilbeny slouží jako prevence proti onemocněním (zejména chronickým – diabetes mellitus, rakovina, kardiovaskulární choroby, neurodegenerativní onemocnění) nikoliv jako přímá léčba u probíhajících nemocí (Dvorakova & Landa 2017).

Ačkoliv u stilbenů zatím převažují pozitivní vlastnosti nad těmi negativními (například genotoxickými), u některých z nich jsou potřebné další studie před jejich použitím v průmyslu, aby byla zajištěna bezpečnost spotřebitelů (Medrano-Padial et al. 2021).

### 3.2.1 Resveratrol

Resveratrol (Obrázek č. 3), strukturálním názvem 3,5,4'-trihydroxy-*trans*-stilben, se řadí mezi nejvýznamnější zástupce stilbenoidů a poprvé byl objeven v kýchavici velkokvěté (*Veratrum grandiflorum*) (Poulose et al. 2015). Díky tomu, že resveratrol ve své chemické struktuře obsahuje hydroxylové skupiny, aromatická jádra a ethylenový můstek, tak může podléhat řadě chemických reakcí (Tian & Liu 2020). Tato organická sloučenina přirozeně vytváří dva izomery *cis* a *trans*, ale vyskytuje se především ve formě *trans*-izomeru, jenž je více stabilní i bioaktivnější (Chaplin et al. 2018; Tian & Liu 2020). Nicméně resveratrol je vysoce fotosenzitivní a po vystavení slunečnímu záření je jeho *trans*-izomer z velké části přeměňován (R. Neves et al. 2012). Důležitou roli při vzniku nových fotoproduktů *trans*-resveratrolu (*cis*-resveratrol, fenantren-2,4,6-triol a 2-(4-hydroxyfenyl)-1-benzofuran-5,6-dion) hraje především UV B spektrum slunečního záření a délka jeho expozice (Zhao et al. 2015). Resveratrol není citlivý pouze k UV B záření, ale také k oxidaci. Oxidace resveratrolu je výrazně ovlivněna obsahem některých dalších látek (příkladem jsou hydrogenuhličitanové ionty) i pH prostředí (Yang et al. 2010).

Resveratrol je syntetizován skrze šikimátovou dráhu v široké škále rostlinných druhů. Rostlinami je resveratrol využíván jako ochrana proti mikrobiálním infekcím (často způsobené plísní *Botrytis cinerea*), ale také proti ultrafialovému záření. Získává se z jejich kořenů, stonků, listů, květů, plodů a semen. Nachází se například v křídlatce japonské (*Polygonum cuspidatum*), révě vinné a podzemnici olejné (Jung et al. 2009; Riccio et al. 2020).



Obrázek 3 Chemická struktura *trans*-resveratrolu

V současné době se jako zdroj pro jeho extrakci využívají zejména červené hrozny. Uvádí se, že ve slupce čerstvých hroznů je obsah resveratrolu přibližně  $5-10 \times 10^{-2}$  g/kg (Tian & Liu 2020). Konzumace červeného vína je spojována s tzv. francouzským paradoxem. Pod tímto slovním spojením se skrývá skutečnost, že ve Francii je výrazně nižší úmrtnost na kardiovaskulární choroby, než je tomu v jiných zemích (Velká Británie, Spojené státy americké) i přes to, že Francouzi konzumují potraviny s vysokým obsahem nasycených mastných kyselin (sýry, fois gras apod.) (Renaud & de Lorgeril 1992). Možným vysvětlením je mírná a pravidelná konzumace červeného vína, ve kterém je obsaženo vyšší množství resveratrolu než například v bílém víně. Vyšší koncentrace resveratrolu v červeném víně je částečně způsobena rozdílnými postupy při technologickém zpracování (Kopp 1998).

Červené víno a extrakty z vína nepůsobí pozitivně pouze proti kardiovaskulárním onemocněním, ale také proti nežádoucím patogenním mikroorganismům (Jung et al. 2009). Paulo et al. (2010) se ve svém *in vitro* výzkumu zaměřili na to, proti kterým patogenním bakteriím resveratrol působí. Bylo zjištěno, že resveratrol má větší antimikrobiální efekt na grampozitivní bakterie (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* a další) pravděpodobně z důvodu odlišného strukturálního a chemického složení. Zatímco u gramnegativních bakterií (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*) byl pozorován pouze pokles růstu, tak u grampozitivních bakterií bylo zcela zastaveno jejich množení (Paulo et al. 2010).

Nicméně resveratrol neinteraguje pouze s patogenními mikroorganismy, ale také s běžně se vyskytujícími bakteriemi ze střevního prostředí, u kterých je schopný změnit množství jejich výskytu (Jaimes et al. 2019). Z důvodu vlivu resveratrolu na střevní mikrobiotu vznikly studie zaměřené i na opačné působení. Výsledky z těchto studií dokazují, že střevní mikrobiota se hojně podílí na metabolismu resveratrolu za vzniku nových látek (Jung et al. 2009; Bode et al. 2013; Jarosova et al. 2019).

Resveratrol je kromě antimikrobiálních vlastností dobře znám i svými dalšími pozitivními účinky na zdraví, zejména antioxidačními, protizánětlivými, antikarcinogenními, neuroprotektivními a také antivirovými (má vliv na RNA i DNA viry) (Poulose et al. 2015; Benedetti et al. 2020). Z důvodu nově objeveného typu koronaviru (SARS-CoV-2) v roce 2019 se vědci pokusili zjistit možný léčebný účinek resveratrolu i proti virům tohoto typu. Pasquereau et al. (2021) se ve své *in vitro* studii zabývají antivirovým působením resveratrolu a uvádí, že resveratrol inhibuje replikaci virů HCoV-229E a SARS-CoV-2.

Ačkoliv má *trans*-resveratrol různé terapeutické vlastnosti, jeho využití *in vivo* je prozatím omezeno nízkou biologickou dostupností. Snížená biologická dostupnost je zapříčiněna především špatnou rozpustností ve vodě, omezenou stabilitou a metabolismem resveratrolu uvnitř trávicího traktu (Zupančič et al. 2015). Z tohoto důvodu existuje snaha vytvořit vhodnou strategii, pomocí které by bylo dosaženo zvýšené biologické dostupnosti resveratrolu. Tímto problémem se zabývají například Brotons-Canto et al. (2020), kteří u lidí sledovali změny koncentrace resveratrolu v krevní plasmě po orálním podání zeinových nanočástic s obsahem resveratrolu. Tato forma podání byla dobře snášena a koncentrace resveratrolu i jeho metabolity byly v plasmě lépe kvantifikovány. Výsledky ukazují, že perorální podání enkapsulovaného resveratrolu v zeinu může být vhodná forma pro zvýšení jeho biologické dostupnosti, ale také dalších polyfenolů (například flavonoidů) (Brotons-Canto et al. 2020). Liu et al. (2020) využili kombinaci *in vitro* (model Caco-2 buněčné monovrstvy) a *in vivo* metody (orální podání potkanům), která se také zabývá vlivem enkapsulace resveratrolu na biologickou dostupnost. Pomocí *in vitro* metody bylo zjištěno, že buněčný příjem a transport skrze membránu je znatelně lepší u zapouzdřeného resveratrolu nežli u volného. V *in vivo* výzkumu na potkanech vědci došli ke stejnému závěru jako v předešlé studii, a to k takovému, že enkapsulace zvyšuje biologickou dostupnost resveratrolu a prodlužuje dobu jeho výskytu v plasmě.

V posledních letech vzrostla snaha najít také jiný způsob podání, který by zlepšil farmakokinetické vlastnosti sloučenin s extenzivním metabolismem. Ukázalo se, že podání plicní cestou by mohlo být další možnou variantou pro zvýšení biologické dostupnosti. Kromě toho bylo zjištěno, že by se přímým dodáním resveratrolu do plic a jeho rychlou

akumulací v tkáních mohl potenciálně využívat při léčbě plicních onemocnění (chronická obstrukční nemoc, rakovina plic a další) (Kong et al. 2020). Přestože má resveratrol prospěšné účinky stále se zkoumá jeho metabolismus, protože se předpokládá, že jeho metabolity mají vyšší aktivitu i účinnost než mateřská sloučenina (Wenzel & Somoza 2005).

### 3.3 Metabolomika

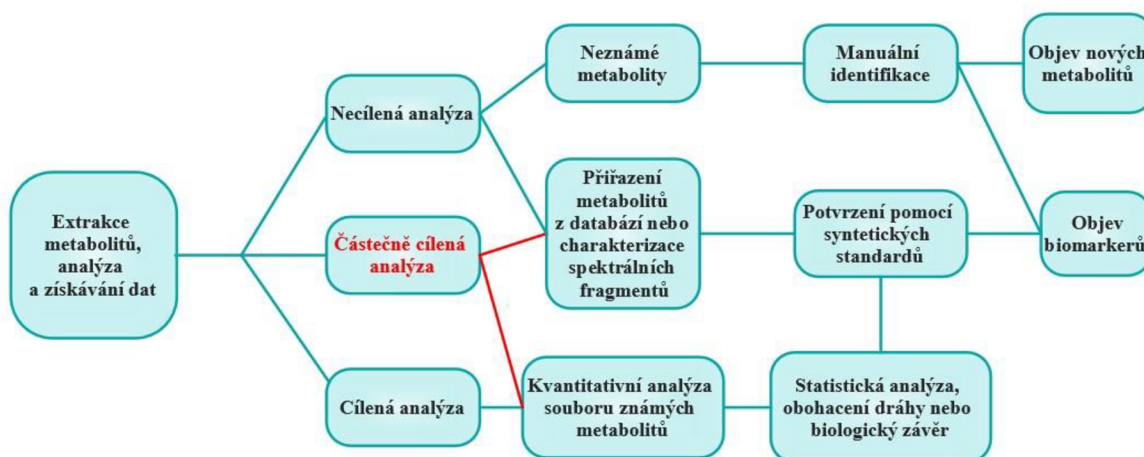
Metabolomika, jedna z řady vědních disciplín, které mají v názvu příponu „-omika“ (například genomika, proteomika a transkriptomika), je využívána v mnoha oblastech přírodních věd (Pinu et al. 2019). Tato poměrně mladá technologie zajišťuje identifikaci a charakterizaci nízkomolekulárních metabolitů v biologických vzorcích. Soubor všech nalezených metabolitů v daném systému se nejčastěji označuje zkráceným pojmem metabolom (Jin et al. 2019). V biologickém kontextu nám metabolom říká, co se ve vzorku přesně odehrálo za děje a představuje tak přímý podpis buněčné aktivity (Kim et al. 2018). Metabolom lze dělit podle jeho původu na endometabolom a exometabolom. Endometabolom souvisí s intracelulárními metabolismy látek, avšak exometabolom, někdy označovaný jako metabolická stopa nebo sekretom, se vztahuje k extracelulárním metabolismům. U savců se metabolomy dělí spíše podle typu biologických vzorků, kam se řadí plasma, moč, stolice, sliny, mozkomíšní mok a různé tkáně (Dunn et al. 2011).

Metabolomika jako taková není definována přímo experimentem, ale odráží studium metabolismu komplexním způsobem. Můžeme ji dělit na cílenou, částečně cílenou a necílenou (Obrázek č. 4). Cílené experimenty prohlubují dosavadní znalosti testováním konkrétních hypotéz (Liu & Locasale 2017). Jejich hlavním úkolem je kvantifikovat co nejvíce metabolitů a statistická analýza se provádí s přesnými koncentracemi sloučenin. Na druhou stranu v necílených analýzách se k rozlišení mezi vzorky a skupinami používá spíše spektrální srovnání a jednotlivé metabolity nejsou kvantifikovány (Hatzakis 2019). Tyto necílené screeningové experimenty mohou být užitečné především při identifikaci dosud neznámých metabolitů (Liu & Locasale 2017). Nicméně identifikace a validace vlastností metabolitů jsou kvůli široké fyzikálně-chemické rozmanitosti metabolomu stále považovány za problematická místa výzkumu (Kim et al. 2018).

Z důvodu celkové náročnosti metabolomiky se k analýze využívají různé analytické techniky. Mezi nejčastěji aplikované analytické metody patří spektroskopie nukleární magnetické rezonance (neboli NMR spektroskopie) a dále hmotnostní spektrometrie, která může být před samotnou detekcí spojena s chromatografií nebo s elektroforetickou separací (Dunn et al. 2011). NMR spektroskopie je preferována především díky souběžné identifikaci a kvantifikaci metabolitů, robustnosti a schopnosti reprodukovat data. Nicméně nedostatek této metody tkví v citlivosti detekce, která může pokrývat pouze omezený rozsah metabolitů s vyšší hojností (Pinu et al. 2019). Zatímco u NMR spektroskopie je citlivost detekce metabolitů nevýhodou, tak u hmotnostní spektrometrie je tato vlastnost hlavní předností (Jin et al. 2019). Ve srovnání s NMR je při hmotnostní spektrometrii potřeba malé množství vzorku, ale metoda patří mezi destruktivní. Z tohoto důvodu nelze analyzovat živé vzorky ani analyzované vzorky znovu použít (Emwas et al. 2019).

Obsah metabolitů zjištěný v biologických vzorcích je významně ovlivněn synergickými účinky vnitřních (mikrobiota, oxidativní stres, záněty) i vnějších faktorů (zemské klima,

polutanty, patogeny, potraviny, léky a další) (Kim et al. 2018). Metabolity se účastní biochemických procesů, které souvisí i nesouvisí s jejich syntézou nebo spotřebou (Dunn et al. 2011). Za posledních pár let byly díky metabolomice objeveny jak nové mechanismy a biomarkery v potravinách či výživě, tak informace o buněčných procesech v lidském těle s možným využitím ve zdravotnictví (Damiani et al. 2020). V budoucnu by metabolomika mohla bezpochyby hrát rozhodující roli ve zdravotnictví, a to při zrychlení porozumění mechanismů, které jsou základem některých onemocnění (například diabetes mellitus, obezita, neurodegenerativní choroby a rakovina) (Kim et al. 2018).



Obrázek 4 Obecný pracovní postup cílené, částečně cílené a necílené metabolické analýzy (převzato a upraveno z Liu & Locasale 2017)

I když je metabolomika využívána zejména v oblasti farmacie a bioanalytických oborů, tak začíná být nepostradatelná při studiu interakcí mezi rostlinami a patogeny, ale také při studiu metabolismů v samotných rostlinách. Jedním možným příkladem je použití metabolomiky k detekci metabolitů, které jsou vylučovány patogeny během kolonizace rostlin a procesů s tím spojených (Castro-Moretti et al. 2020). Dále se u rostlin pomocí metabolomiky zkoumá jejich reakce na různé abiotické (teplota, vlhkost vzduchu, dostupnost vody, obsah živin v půdě, oxidační stres a další) a biotické (způsobené patogeny a škůdci) stresové podněty. Do budoucna existuje snaha tyto poznatky uplatnit v zemědělství zejména ke šlechtění rostlin pro lepší výnos a kvalitu zemědělských plodin (Hong et al. 2016).

S rostoucími požadavky na potraviny se metabolomika začíná používat v několika oblastech potravinářství jako je kvalita a bezpečnost potravin, zpracování potravin a výživa. Mezi příklady těchto aplikací patří sledování původu a kvality piva, hodnocení olejů, sledování změn složení během kvašení vína i hodnocení profilu metabolitů geneticky modifikovaných potravin (Hatzakis 2019). Metabolomika se zaměřuje také na detekci mikrobiálních toxinů, reziduí veterinárních léčiv a pesticidů, aby byla zajištěna co nejvyšší bezpečnost potravin. Nicméně v této oblasti je zapotřebí stále vylepšovat metody přípravy ke zlepšení citlivosti a výkonosti detekce, jelikož některé přírodní toxiny jsou i při velmi nízkých koncentracích extrémně toxické (Li et al. 2021). Z hlediska zpracování potravin roste také potřeba kontrolovat, zda nejsou potraviny falšované. U každého výrobku existují určité biomarkery, podle kterých se autenticita posuzuje. Bylo však zjištěno, že mezi markery syrových a zpracovaných potravin



existuje rozdíl a tím pádem při navrhování nových markerů pro ověřování pravosti potravin musí proběhnout kontrola v obou zmíněných variantách (Brigante et al. 2020). Metabolomika má v potravinářství obrovský potenciál, ale stále existují jisté překážky (citlivost metod, složitá statistická analýza velkého množství dat, informační databáze a další), které musí být překonány (Li et al. 2021).

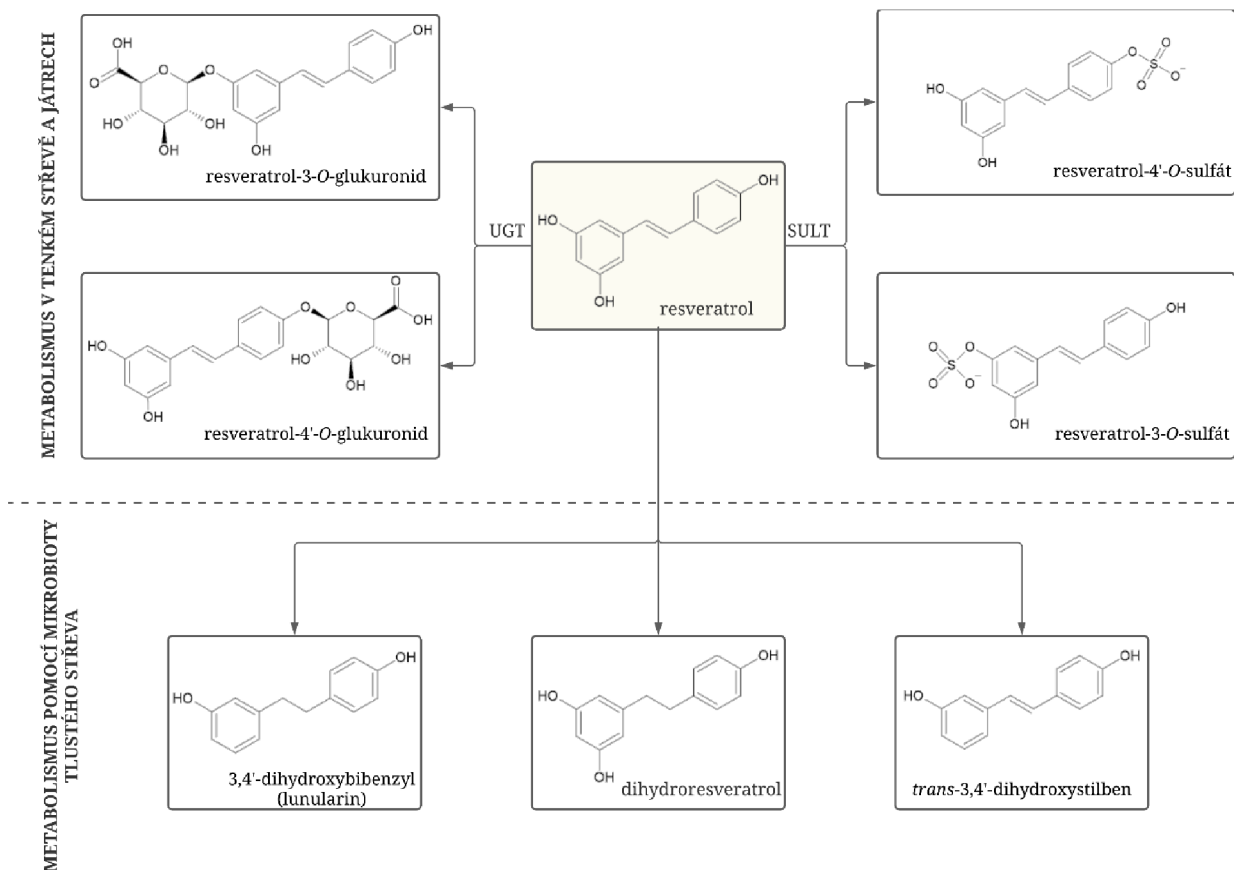
### 3.4 Metabolismus resveratrolu

Intenzivní metabolismus resveratrolu, který probíhá zejména v játrech a ve střevech, je považován za hlavní příčinu jeho špatné biologické dostupnosti (Zhang et al. 2021). Dalším faktorem, jenž se s vysokou pravděpodobností podílí na nízké biologické dostupnosti resveratrolu, je jeho obousměrný transport přes epiteliální buňky (Jarosova et al. 2020). Zásadní roli při biotransformaci resveratrolu hrají metabolické enzymy Fáze II a střevní mikrobiota (Obrázek č. 5). Rychlost i průběh metabolismu jsou dále ovlivněny aplikační dávkou, druhem tkání, pohlavím, zdravotním stavem a dalšími faktory (Wang & Sang 2018). Transformace resveratrolu probíhá za vzniku látek s rozdílnou chemickou strukturou i s odlišnými biologickými vlastnostmi. Tyto metabolity a mechanismy probíhající při metabolismu resveratrolu však ještě potřebují být plně objasněny (Bode et al. 2013).

Resveratrol, podobně jako většina fenolických sloučenin, po perorálním podání podléhá reakcím v metabolických drahách zvaných Fáze I a Fáze II (El Khawand et al. 2018). Fáze I zahrnuje základní chemické reakce jako je oxidace, redukce a hydrolýza, ale také mnoho dalších. Tyto reakce umožňují připravit danou sloučeninu na Fázi II, kde dochází k dalším přeměnám a uvolňování ve vodě rozpustných produktů (Gibson & Skett 1986).

Jak již bylo zmíněno, na přeměně resveratrolu se ve Fázi II podílí metabolické enzymy uridin-5'-difosfát-glukuronosyltransferázy (UGT) a sulfotransferázy (SULT). Tyto enzymy katalyzují dvě základní chemické reakce ve Fázi II, kterými jsou glukuronidace a sulfatace (Wang & Sang 2018). Právě těmito zmiňovaným reakcím resveratrol podléhá nejvíce v tenkém střevě a játrech za vzniku glukuronidových (resveratrol-3-*O*-glukuronid a resveratrol-4'-*O*-glukuronid) a sulfátových konjugátů (resveratrol-3-*O*-sulfát, resveratrol-4'-*O*-sulfát a resveratrol-3,4'-*O*-disulfát) (Wang & Sang 2018; El Khawand et al. 2018). V tenkém střevě převládá výskyt resveratrol-4'-*O*-glukuronidu a resveratrol-3-*O*-glukuronidu, kdežto sulfátové konjugáty byly ve vyšším množství detekovány i v tlustém střevě (Zhang et al. 2021). Zmiňované metabolické dráhy se ve svém výzkumu věnovali (Jarosova et al. 2020). Zaměřili se na metabolismus *trans*-resveratrolu v *in vitro* epiteliálním modelu s využitím Caco-2 buněčné linie. Bylo zjištěno, že resveratrol-3-*O*-sulfát je hlavním metabolitem *trans*-resveratrolu v epiteliálním modelu a jeho koncentrace byla třikrát vyšší než součet koncentrací resveratrol-3-*O*-glukuronidu a resveratrol-4'-*O*-glukuronidu (Jarosova et al. 2020). Konjugáty resveratrolu s možným zbytkem nepřeměněného resveratrolu opouští apikální membránu tenkého střeva a postupně se přemísťují do tlustého střeva, kde mohou být dále metabolizovány střevní mikrobiotou a vyloučeny stolicí (Springer & Moco 2019).

Kromě předešlého způsobu transportu resveratrolu existuje i druhá možnost. Resveratrol a jeho katabolity opouští enterocyty a následně se dostávají krevním řečištěm do jater, ledvin a periferních tkání (Springer & Moco 2019). Wenzel & Somoza (2005) zmiňují *in vivo* studii prováděnou na potkanech, ve které bylo zjištěno, že nejvyšší koncentrace resveratrolu v játrech a ledvinách je detekovatelná již po jedné hodině od perorálního podání. Avšak zdá se, že koncentrace resveratrolu v ledvinách klesá s časem a koncentrace jeho metabolitů v moči rostou. Z tohoto důvodu se ledviny jeví jako přednostní orgán vylučování (Wenzel & Somoza 2005).



Obrázek 5 Metabolické dráhy resveratrolu (převzato a upraveno z Luca et al. 2019)

V těle však pro konjugáty resveratrolu existuje ještě jedna možná cesta a tou je tzv. enterohepatická cirkulace (Springer & Moco 2019). Během tohoto procesu jsou glukuronidové konjugáty hydrolyzovány zpět na mateřskou sloučeninu pomocí  $\beta$ -glukuronidázy, což je enzym obsažený ve střevě. Volná sloučenina může být potom znovu vstřebána skrz stěnu tenkého střeva a portální žílou transportována do jater. V játrech následně probíhá rekonjugace resveratrolu s kyselinou glukuronovou. Vzniklé glukuronidové konjugáty jsou vylučovány do žluči a poté opět do střeva, kde začíná celý cyklus od znovu. Tato recirkulace může probíhat i několikrát za sebou. Celkový výsledek je takový, že sloučenina je mnohem déle zadržována v těle a má zvýšený poločas rozpadu. Z toho plyne, že tento cyklus založený na metabolismu může vyústit v prodloužení farmakologické aktivity dané sloučeniny (Roberts et al. 2002).

Velká část resveratrolu se však absorpci v tenkém střevě vyhne a podléhá mikrobiální přeměně v tlustém střevě. Katabolismus v tlustém střevě je velmi významný zejména z toho důvodu, že je důležitou fází farmakokinetiky chemických entit v lidském organismu. Získání a rozšíření znalostí v této oblasti by mohlo být přínosné především pro validaci biotestu nebo pro vývoj více aktivních substituentů (Jaimes et al. 2019). Při studii metabolismu resveratrolu a jeho osudu v tlustém střevě člověka byly nalezeny tři metabolity: dihydroresveratrol, *trans*-3,4'-dihydroxystilben a 3,4'-dihydroxybibenzyl (lunularin). Přeměna resveratrolu však neprobíhá u všech jedinců stejně, a to zejména kvůli rozdílnému složení střevní mikrobioty. Tento poznatek by měl být brán v úvahu zejména při zjišťování účinků *trans*-resveratrolu na zdraví člověka (Bode et al. 2013). Dihydroresveratrol se uvádí jako hlavní mikrobiální metabolit resveratrolu, který vzniká hydrogenací dvojně vazby ethylenového můstku (Jarosova et al. 2019). Dihydroresveratrol může být částečně absorbován a dále metabolizován na konjugované formy (dihydroresveratrol monosulfát a dihydroresveratrol monoglukuronid), které lze z organismu snadno vyloučit močí (Luca et al. 2019). Vzniklým

katabolitům resveratrolu se věnuje pozornost především proto, že mohou představovat biologicky významnější formy sloučenin s fyziologickými účinky (Bode et al. 2013).

### 3.5 Interakce mezi resveratrolem a mikrobiotou

Resveratrol se řadí do velké skupiny polyfenolů, u jejichž zástupců se všeobecně předpokládá, že dokáží uplatnit svůj vliv na střevní mikrobiotu. Toto působení však může nastat pouze tehdy, pokud se do tlustého střeva dostanou nestrávené a nevstřebají se v předchozích pasážích trávicího traktu (Makarewicz et al. 2021). Důvod je takový, že právě nevstřebané fenolické látky společně s na stravě nezávislými substráty (jako je endogenní sekrece hostitele) tvoří základ potřebný pro metabolismus polyfenolů střevními bakteriemi (Jaimes et al. 2019). Polyfenoly mohou působit například jako prebiotika, stimulovat růst střevní mikrobioty nebo jsou naopak schopny růst některých druhů inhibovat (Makarewicz et al. 2021). Účinky samotného resveratrolu na organismus jsou z velké části připisovány modulaci střevní mikrobioty a působení mikrobiálních metabolitů, které ovlivňují geny i metabolické dráhy hostitele (Seyed Hameed et al. 2020).

Zhang et al. (2021) patří do skupiny vědců, kteří se věnují výzkumu metabolismu resveratrolu a jeho vztahu se střevní mikrobiotou. Ve své *in vitro* studii odhalili, že na střevní mikrobiotu působí především metabolity resveratrolu, a nikoliv resveratrol samotný. Resveratrol-3-*O*-sulfát dokáže inhibovat růst některých střevních mikrobů (*Bacteroides caecimuri*, *Bacteroides satorii*, *Blautia producta*, 2 neklasifikované druhy z čeledi Ruminococcaceae a další) nebo naopak jejich růst podporuje. K druhé variantě se řadí významně zvýšený výskyt několika druhů bakterií z rodu *Lactobacillus* (*Lactobacillus reuteri* a *Lactobacillus intestinalis*) a *Streptococcus hyointestinalis* (Zhang et al. 2021).

Účinky resveratrolu na střevní mikrobiotu se zabývali také Jaimes et al. (2019), kteří k výzkumu využili *in vitro* fekální fermentační systém. Při srovnání vzorků s kontrolou byl pozorován pokles poměru bakterií kmene Firmicutes ku Bacteroidetes, ale také pokles relativního množství bakterií z rodu *Clostridium* a čeledi Lachnospiraceae. Naopak u bakterií *Faecalibacterium prausnitzii* a *Ruminococcus gnavus* byl zaznamenán nárůst relativního množství (Jaimes et al. 2019). Zvýšené relativní množství *F. prausnitzii* po aplikaci resveratrolu se jeví jako benefit, jelikož tento druh je důležitým zástupcem střevní mikrobioty a pravděpodobně má příznivý dopad na fyziologii a zdraví hostitele. *F. prausnitzii* slouží jako jedinečný bakteriální indikátor nebo biomarker střevního zdraví u lidí a také aktivně udržuje střevní homeostázu díky svým imunomodulačním vlastnostem (Leylabadlo et al. 2020). Naopak *R. gnavus* má souvislost s různými onemocněními, jako jsou idiopatické střevní záněty, divertikulární nemoc, respirační alergie u kojenců a septická artritida. *R. gnavus* dokáže odbourávat mucin a také zvládne využívat *trans*-sialidázu k odštěpení volné kyseliny sialové. Tyto schopnosti poskytují bakterii *R. gnavus* konkurenční výhodu zejména u pacientů s onemocněním dráždivého tračníku, kde je přítomen vyšší podíl krátkých mucinových řetězců s terminální kyselinou sialovou (la Reau & Suen 2018).

Dao et al. (2011) se zaměřili na výzkum mechanismu, který je základem antidiabetického účinku resveratrolu. Během této studie odhalili, že pětitédenní podávání resveratrolu (60 mg/kg/den) myším na vysokotučné dietě dokáže upravit složení střevní mikrobioty. Pomocí denaturační gradientové gelové elektroforézy byly identifikovány bakterie, u kterých resveratrol přímo ovlivnil jejich množství. Mezi zmíněné bakterie patří *Parabacteroides jonsonii*, *Alistipes putredinis* a *Bacteroides vulgatus* (Dao et al. 2011). Qiao et al. (2014) uvádí podobnou studii, která se také zabývala modulací střevní mikrobioty, jež je základem antidiabetického působení resveratrolu. Po dvanáctitédenním podávání resveratrolu (200 mg/kg/den) myším na vysokotučné dietě byl výrazně zvýšen počet bakterií z rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, zatímco u *Enterococcus faecalis* byl v množství pozorován

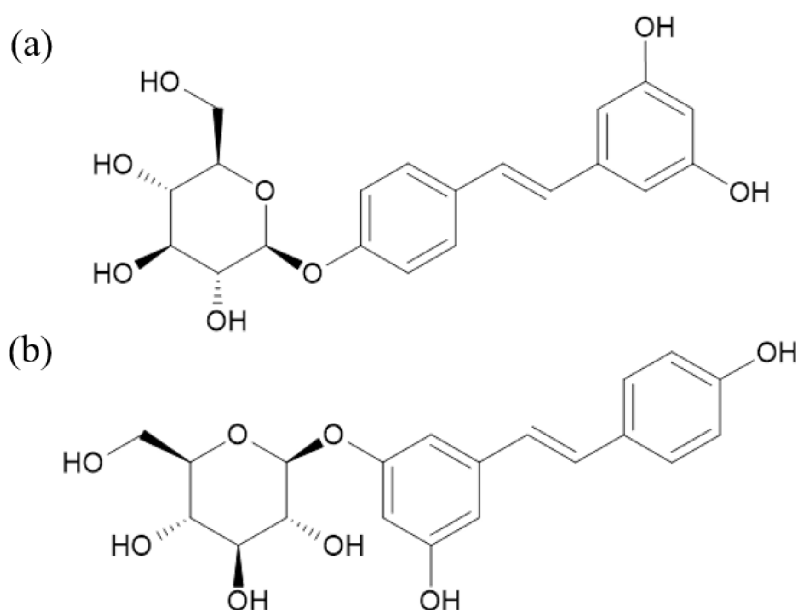
zřetelný pokles. Došlo také ke změně poměru bakterií kmene Firmicutes ku Bacteroidetes a to tak, že množství bakterií z kmene Bacteroidetes se zvýšilo (Qiao et al. 2014). Z výsledků podobné *in vivo* studie Yin et al. (2020), která byla také prováděna na myších s vysokotučnou dietou, vyplývá shodný závěr. Myši léčené resveratrolem vykazovali významné zvýšení relativního výskytu Bacteroidetes a snížení relativního výskytu Firmicutes (Yin et al. 2020). Ke zvýšení relativního množství Bacteroidetes došlo i ve studii Wang et al. (2020), kdy byl resveratrol rovněž podáván myším na vysokotučné dietě, avšak o 4 týdny déle a ve vyšší dávce (300 mg/kg/den). Celkově by tato zjištění mohla naznačovat možný prebiotický účinek resveratrolu na střevní mikrobiotu, který může ovlivňovat metabolismus hostitele (Qiao et al. 2014). Z výsledků studie Wang et al. (2020) bylo dále zjištěno, že aplikace resveratrolu ovlivnila i jiné bakterie a tím významně změnila skladbu střevní mikrobioty. Došlo jak ke zvýšení hojnosti bakterií z rodu *Blautia* spp. a *Lachnoclostridium* spp., tak k poklesu relativního výskytu škodlivých bakterií z rodu *Desulfovibrio* spp. a čeledi Lachnospiraceae NK4A136 (Wang et al. 2020).

V další studii od Etxeberria et al. (2015) bylo zkoumáno, zda podávání *trans*-resveratrolu (15 mg/kg/den) potkanům, kteří byli na dietě sacharózy a vysokého obsahu tuku (HFS dieta), může ovlivnit tvorbu střevní mikrobioty. *Trans*-resveratrol výrazně snížil průměr relativního množství některých druhů bakterií z rodu *Clostridium*, jako je *Clostridium aldenense*, *Clostridium hathewayi*, *Clostridium* sp. C9 a *Clostridium* sp. MLG661. Po suplementaci *trans*-resveratrolu byl dále pozorován pokles v množství také u *Gracilibacter thermotolerans* a *Parabacteroides distasonis*. Nicméně další změny ve složení střevní mikrobioty po podání *trans*-resveratrolu nebyly v této studii zaznamenány (Etxeberria et al. 2015). Podle dostupných zdrojů se zdá, že účinek resveratrolu na složení a rozmanitost střevní mikrobioty závisí do značné míry na zvířecím modelu a experimentálních podmínkách (dieta, dávka a délka léčby). Proto je potřeba počítat s jistými odchylkami ve výsledcích u rozdílných experimentálních modelů (Milton-Laskibar et al. 2021).

Podání čistého resveratrolu neovlivňuje pouze složení střevní mikrobioty jako takové, ale dokáže měnit průběh metabolických drah, což způsobuje změnu v metabolomu moči a stolice. Z toho vyplývá, že resveratrol společně s metabolity může mít přímý vliv na obousměrnou komunikaci mezi střevní mikrobiotou a hostitelem. Tento poznatek byl potvrzen během studie, kdy resveratrol i jeho metabolity interagovaly s osou mikrobiom-střevo-játra-ledviny a podporovaly změny v endogenním metabolomu. Vzhledem k akumulaci resveratrolu a jeho metabolitů ve střevě je možné tyto změny pozorovat při souběžné produkci mikrobiálních metabolitů (Torres Santiago et al. 2019).

Vlivem lidské střevní mikrobioty a její rozmanitosti na metabolismus *trans*-resveratrolu se ve své studii zabývají Bode et al. (2013). V této studii byla u vybraných fekálních bakteriálních druhů (například u *Adlercreutzia equolifaciens*, *Bacteroides vulgatus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactococcus garvieae*, *Slackia equolifaciens* a dalších) zkoumána schopnost metabolizovat *trans*-resveratrol při pěstování v čisté kultuře po dobu až 96 hodin. I když mezi testovanými bakteriemi byly takové, které dokáží metabolizovat jiné fenolické látky, tak pouze dvě bakterie z čeledi Coriobacteriaceae (*S. equolifaciens* a *A. equolifaciens*) byly schopny přeměnit resveratrol na dihydroresveratrol (Bode et al. 2013). Tyto výsledky jsou ve shodě se studií od Jung et al. (2009), kde *Eggerthella lenta* ATCC 43055 také patří do čeledi Coriobacteriaceae byla identifikována jako producent dihydroresveratrolu. Na základě těchto výsledků lze předpokládat, že do mikrobiální transformace *trans*-resveratrolu a zároveň produkce hlavního metabolitu (dihydroresveratrol) jsou pravděpodobně zapojeny i další rody ze zmíněné čeledi. Nicméně Jung et al. (2009) zkoumali účinek i jiných bakterií na resveratrol. Bylo prokázáno, že schopnost produkovat dihydroresveratrol má také *Bacteroides uniformis* ATCC 8492. Tímto výsledkem se otevírá

možnost, že existují i další druhy z rodu *Bacteroides* spp., které jsou schopny resveratrol metabolizovat. Tato studie se nezaměřovala pouze na vznik dihydroresveratrolu, ale také uvádí, že *Bacillus cereus* NCTR-466 je schopný převést resveratrol na resveratrolosid a piceid (Obrázek č. 6) (Jung et al. 2009). Glykosylované formy *trans*-resveratrolu mají po transepiteliálním průchodu srovnatelné biologické účinky a rovněž mohou být hydrolyzovány do deglykosylovaných forem resveratrolu. Avšak bylo zjištěno, že glykosylované analogy resveratrolu vykazují silnější bioaktivitu (Salehi et al. 2018). Zhao et al. (2019) provedli *in vitro* a *in vivo* studie, ve kterých se zaměřili na účinky resveratrolosidu. Zjistili, že resveratrolosid má schopnost regulovat hladiny postprandiální glukózy v krvi. Současná zjištění ukazují, že resveratrolosid lze považovat za potenciální možnost léčby diabetes mellitus a může být prospěšný pro zdraví spotřebitelů. Fabris et al. (2008) se naopak zabývali již zmíněným piceidem a bylo odhaleno, že se vyznačuje podobně silnou antioxidační aktivitou jako má resveratrol, ale zdá se být při reakci s radikály účinnější.



Obrázek 6 Chemické vzorce: (a) resveratrolosid, (b) piceid

### 3.6 Zdravotní účinky resveratrolu

Resveratrol je považován za nutraceutikum patřící do skupiny stilbenoidů, jenž je široce distribuovaný v rostlinném království. Vyznačuje se širokou škálou biologických vlastností, mezi které se řadí například kardioprotektivní, antioxidační, neuroprotektivní, protizánětlivé a protirakovinné aktivity. Ačkoliv se resveratrol v tradiční medicíně používá při léčbě bolesti žaludku, artritidy, infekcí močových cest, houbových onemocněních nebo zánětů kůže, tak hlavní biologický potenciál resveratrolu zřejmě spočívá v ochraně myokardiálních buněk. Kromě zmíněných účinků bylo prokázáno, že je schopný dokonce ovlivňovat iniciaci a progresi mnoha nemocí prostřednictvím několika mechanismů (Salehi et al. 2018). Potenciálních mechanismů zodpovídajících za účinky resveratrolu existuje mnoho. Jelikož resveratrol spouští expresi různých antioxidačních enzymů, je i stanovení příspěvku každého mechanismu k celkovému snížení oxidačního stresu složitým úkolem. Vliv na biologické účinky resveratrolu může mít také jeho interakce s velkým počtem receptorů, kináz a dalších enzymů (Ramírez-Garza et al. 2018a).

### 3.6.1 Efekt resveratrolu na kardiovaskulární choroby

Kardiovaskulární choroby zahrnují onemocnění srdce, cévní onemocnění mozku a onemocnění krevních cév. Souhrn různých typů kardiovaskulárních chorob společně s rizikovými faktory, které napomáhají k jejich vzniku, je zobrazen na Obrázku č. 7. Kardiovaskulární onemocnění se považují za celosvětově nejčastější příčinu smrti, což představuje více než 17 milionů úmrtí ročně. Předpokládá se, že do roku 2030 počet úmrtí na kardiovaskulární onemocnění výrazně vzroste, a to na více než 23,6 milionů úmrtí za rok (Mendis et al. 2011). Právě zvýšená incidence kardiovaskulárních chorob je podnětem pro hledání a výzkum látek, které by mohly zlepšit kardiovaskulární zdraví (Bonfont-Rousselot 2016).

Jednou z takových látek je resveratrol, u něhož se předpokládají příznivé účinky na některé kardiovaskulární choroby, včetně hypertenze, obezity, dyslipidémie a dalších. Pozornost se také věnuje farmakologickému využití resveratrolu k léčbě onemocnění, která jsou spojována se zvýšeným rizikem rozvoje kardiovaskulárních chorob (například metabolický syndrom) (Saad et al. 2020). Mezi příklady kardioprotektivních mechanismů resveratrolu patří přímé vychytávání radikálů (zejména superoxidů a hydroxylových radikálů) a regulování endoteliální syntázy oxidu dusnatého, která podporuje vazodilataci i snížení agregace krevních destiček zprostředkovanou oxidem dusnatým (Bonfont-Rousselot 2016).

<u>Typy kardiovaskulárních chorob</u>	<u>Rizikové faktory kardiovaskulárních chorob</u>
<p><b>1. Kardiovaskulární choroby způsobené aterosklerózou:</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>▸ Ischemická choroba srdeční</li><li>▸ Cerebrovaskulární onemocnění</li><li>▸ Onemocnění aorty a tepen, hypertenze</li></ul> <p><b>2. Ostatní kardiovaskulární choroby:</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>▸ Vrozené srdeční vady</li><li>▸ Revmatická srdeční choroba</li><li>▸ Kardiomyopatie</li><li>▸ Srdeční arytmie</li></ul>	<p><b>1. Behaviorální rizikové faktory:</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>▸ Kouření</li><li>▸ Nízká fyzická aktivita</li><li>▸ Nezdravá strava</li><li>▸ Nadměrná konzumace alkoholu</li></ul> <p><b>2. Metabolické rizikové faktory:</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>▸ Hypertenze</li><li>▸ Zvýšená hladina cukru v krvi</li><li>▸ Zvýšený obsah krevních lipidů</li><li>▸ Nadváha, obezita</li></ul> <p><b>3. Další rizikové faktory:</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>▸ Chudoba a nízké vzdělání</li><li>▸ Pohlaví</li><li>▸ Genetika</li><li>▸ Psychologické faktory (např. stres, deprese)</li></ul>

Obrázek 7 Typy kardiovaskulárních chorob a jejich rizikové faktory (převzato a upraveno z Mendis et al. 2011)

Při výzkumu vlivu resveratrolu na kardiovaskulární choroby je velmi důležité brát v úvahu velikost dávky, která se během experimentu aplikuje. Tento faktor je podstatný především proto, že finální účinky nízkých a vysokých dávek se mohou lišit a při špatném dávkování zatím nelze vyloučit ani nepříznivé následky (Mankowski et al. 2020). Wong et al. (2011) uvádí studii, během které byla podávána dávka 240 mg resveratrolu (1 × týdně po dobu 4 týdnů) 14 mužům s nadváhou a 5 postmenopauzálním ženám s neléčenou hraniční hypertenzí. Výsledky ukázaly, že tato dávka významně zvýšila průtokem zprostředkovanou dilataci brachiální tepny, jež je biomarkerem endoteliální funkce a kardiovaskulárního zdraví člověka (Wong et al. 2011). Ke zvýšení průtokem zprostředkované dilatace brachiální tepny po podání jedné 300 mg dávky *trans*-resveratrolu došlo i ve studii, která byla prováděna na lidech trpící hypertenzí (ve věku 45 až 65 let). Tento účinek byl však výraznější u žen a pacientů s vyšší hladinou lipoproteinů o nízké hustotě (Marques et al. 2018). Nicméně Mankowski et al. (2020) ve své pilotní studii naopak naznačují, že podávání aplikační dávky 300 mg resveratrolu nijak

neovlivnilo biomarkery kardiovaskulárního rizika u lidí s nadváhou, ale vyšší dávka 1000 mg resveratrolu již zvyšuje hladinu těchto biomarkerů a pro jedince vytváří potenciální riziko. Pro lepší pochopení klinické hodnoty resveratrolu je potřeba dalších studií, které by se zaměřily na výzkum nižších a vyšších aplikačních dávek včetně jejich vlivu na kardiovaskulární funkce, jako je srdeční kontraktilita, endoteliální funkce a arteriální ztuhlost (Mankowski et al. 2020).

### 3.6.2 Efekt resveratrolu na diabetes mellitus

Diabetes mellitus je onemocnění provázené komplexní poruchou metabolismu cukrů, jehož hodnocení a diagnostika je po celá desetiletí předmětem intenzivního zkoumání. Podle etiologické klasifikace lze diabetes mellitus rozdělit na dva základní typy: typ 1 a typ 2. Poslední odhady ukazují, že toto onemocnění se v roce 2017 celosvětově vyskytovalo u 425 milionů lidí a zároveň se očekává, že do roku 2045 celosvětová prevalence vzroste na 629 milionů. Většinu celkové prevalence diabetes mellitus tvoří diabetes mellitus druhého typu, jelikož jeho vznik je podporován celosvětovým nárůstem prevalence obezity a nezdravých návyků, včetně špatné stravy a nedostatku fyzické aktivity (Forouhi & Wareham 2019). Diabetes mellitus druhého typu zahrnuje makrovaskulární komplikace (onemocnění koronárních tepen, onemocnění periferních tepen a mrtvice) a je čtvrtou hlavní příčinu úmrtí ve vyspělých zemích s vysokými příjmy. Zejména kvůli přidruženým problémům se hledají všechny možné prostředky ke zvládnutí této nemoci (Jeyaraman et al. 2020).

Přibývají důkazy, že při vzniku diabetu hraje klíčovou roli oxidační stres a ten také souvisí s dysfunkcí  $\beta$ -buněk, která může být zhoršena oslabenou antioxidační obranou pankreatických ostrůvků. Antioxidační obrana pankreatických ostrůvků může být zvýšena například působením resveratrolu, který se díky těmto účinkům stal atraktivním terapeutickým prostředkem při léčbě diabetu a s ním spojených komplikací (Nanjan & Betz 2010). Bhatt et al. (2012) předpokládali, že orální suplementace resveratrolu (250 mg/den po dobu 3 měsíců) zlepší kontrolu glykémie a související rizikové faktory u indických pacientů s diabetem druhého typu. Studie odhalila, že podávání resveratrolu významně snižuje hladiny glykovaného hemoglobinu, hladinu glukózy v krvi nalačno, celkový cholesterol i celkové bílkoviny. Bohužel studie nezahrnuje výzkum parametrů souvisejících s inzulínem a výsledky by měly být ještě potvrzeny v jiných nezávislých kohortách s větším počtem vzorků od různých etnických skupin (Bhatt et al. 2012).

Diabetu druhého typu se věnují také Timmers et al. (2016), kteří zjišťovali, zda doplnění resveratrolu (150 mg/den po dobu 30 dnů) nad rámec standardní léčby diabetu metforminem může zlepšit citlivost na inzulín a podpořit celkové metabolické zdraví. Po třicetidenním podávání resveratrolu nebylo zjištěno žádné zlepšení citlivosti na inzulín ani žádný efekt na hladinu cirkulujícího inzulínu, krevní glukózy nalačno nebo glykovaného hemoglobinu. Existuje zde možnost, že absence zlepšování citlivosti na inzulín mohla být ovlivněna možnou interakcí metforminu s metabolismem resveratrolu nebo denní dávka 150 mg nebyla schopná aktivovat všechny potřebné mechanismy (například procesy spojené s adenosin-5'-monofosfátem aktivovanou proteinovou kinázou neboli AMPK) (Timmers et al. 2016).

Naopak Hoseini et al. (2019) využili o něco vyšší dávku resveratrolu (500 mg/den), která byla podávána pacientům s diabetem druhého typu a ischemickou chorobou srdeční po dobu 4 týdnů. Příjem resveratrolu u pacientů způsobil výrazné snížení glukózy v plazmě žilní krve nalačno, hladiny inzulínu a inzulínovou rezistenci. Ve srovnání s kontrolní skupinou došlo i ke zvýšení citlivosti na inzulín a hladiny lipoproteinů o vysoké hustotě bez ovlivnění dalších lipoproteinů. Tato zjištění ukázala, že resveratrol může mít slibné účinky při léčbě diabetu (Hoseini et al. 2019). Kontrastní výsledky studií mohou být způsobeny účinky požití dávky, stavem střevní mikrobioty, zdravotním stavem i biologickou dostupností resveratrolu (Ramírez-Garza et al. 2018b).

### 3.6.3 Efekt resveratrolu na neurologická onemocnění

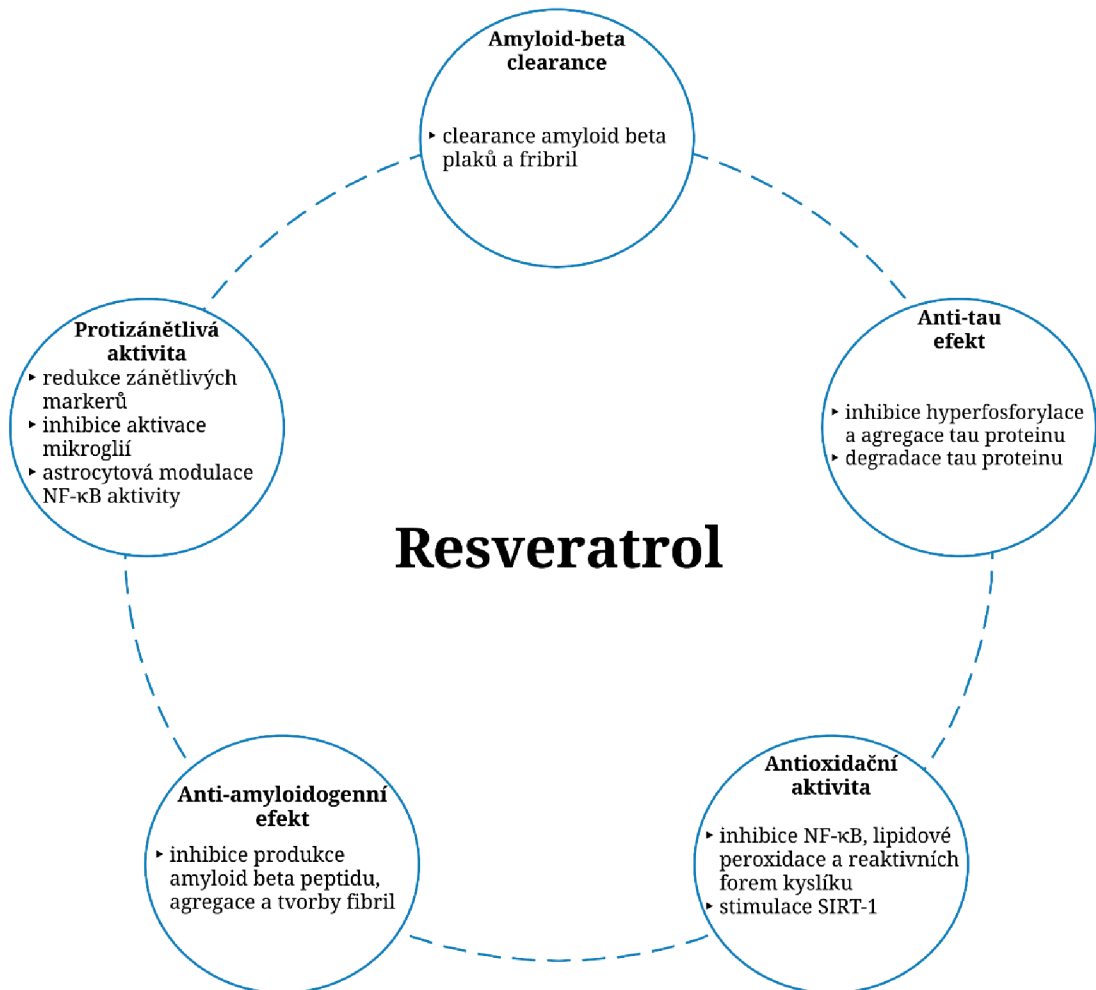
Významné antioxidační vlastnosti resveratrolu jsou pravděpodobně stěžejní i pro jeho efekt na neurologická onemocnění. Během oxidačního stresu neurony produkují poměrně velké množství reaktivních forem kyslíku, což může mít za následek poškození buněčných proteinů a nukleových kyselin. Tento proces může vést k peroxidaci lipidů a ztrátě celistvosti fosfolipidové membrány. Díky přítomnosti hydroxylové skupiny v chemické struktuře resveratrolu, může resveratrol neutralizovat reaktivní formy kyslíku i reaktivní formy dusíku (Komorowska et al. 2020). Vzhledem k tomu, že oxidační stres úzce souvisí s hlavními neuronálními patologiemi, je resveratrol zkoumán a experimentálně využíván k léčbě neurodegenerativních poruch. Pozitivní výsledky byly pozorovány u neurodegenerativních poruch, jako je Alzheimerova choroba, Huntingtonova choroba, mozková ischemie, Parkinsonova choroba, epilepsie a amyotrofická laterální skleróza (Tellone et al. 2015). Nicméně procesy, které jsou základem prospěšného potenciálu resveratrolu ještě nejsou zcela definovány (Zhang et al. 2018).

Alzheimerova choroba je progresivní onemocnění, vyvolává poškození paměti i řeči a také způsobuje poruchy kognitivních funkcí. Incidence tohoto onemocnění je úzce spjata s věkem. Považuje se za nejčastěji se vyskytující formu demence, která postihuje více jak 35 milionů lidí po celém světě. Mezi neuropatologické charakteristiky Alzheimerovy choroby patří extracelulární senilní plaky a neurofibrilární spleti, jež se skládají z plaků amyloid beta peptidu a agregátů hyperfosforylovaného tau proteinu (Andrade et al. 2018). Resveratrol dokáže vyvolat reakce (Obrázek č. 8), pomocí kterých jsou tyto neuropatologické charakteristiky eliminovány a tím snižují riziko vzniku Alzheimerovy choroby. Z toho je zřejmé, že resveratrol lze využít právě v prevenci, ale pro zjištění účinnosti resveratrolu při léčbě jsou vyžadovány další studie (Komorowska et al. 2020). V jedné ze studií zaměřených na léčbu Alzheimerovy choroby byla pacientům podávána dávka 500 mg resveratrolu/den s 500 mg přírůstky každých 13 týdnů až do 52. týdne a konečná dávka byla 1000 mg resveratrolu dvakrát denně. Bylo zjištěno, že takto vysoké dávky resveratrolu jsou bezpečné a pacienti dobře tolerovány. Po podávání resveratrolu došlo ke snížení objemu mozku a k poklesu hladin amyloid beta 40, který však byl pozorován i u placebo skupiny. Ačkoli byly změněny některé trajektorie biomarkerů, na tau protein ani další druhy amyloid beta peptidu nebyl zjištěn žádný léčebný účinek (Turner et al. 2015).

Jelikož druhou nejčastěji se vyskytující neurodegenerativní poruchou je Parkinsonova choroba, tak i zde je zkoumán účinek resveratrolu (Tellone et al. 2015). Mezi pozitivní vlastnosti resveratrolu, které byly zjištěny během experimentu na myších, patří v první řadě zpomalení agregace neuronového proteinu,  $\alpha$ -synukleinu, jež hraje důležitou roli v patogenezi Parkinsonovy choroby. Dále resveratrol dokáže snížit hladiny již vzniklých agregátů  $\alpha$ -synukleinu a redukovat neuroinflamaci i oxidační stres v mozku myši (Zhang et al. 2018). Léčba Parkinsonovy choroby resveratrolem zmírňuje mitochondriální dysfunkci a má neuroprotektivní účinky související s protizánětlivým snížením hladin cyklooxygenázy-2 a faktoru nádorové nekrózy alfa (Jin et al. 2008). Zásadní roli v mitochondriálním metabolismu a boji proti oxidačnímu stresu má koaktivátor  $1\alpha$  receptoru pro peroxisomový proliferátor (PGC- $1\alpha$ ), který je resveratrolem aktivovaný prostřednictvím deacytelázy sirtuin 1 (SIRT-1) v dopaminergních neuronech (Mudò et al. 2012). Obecně aktivace PGC- $1\alpha$  vede ke zvýšení mitochondriální biogeneze a zlepšuje mitochondriální funkci (Tellone et al. 2015). Zabezpečení správné funkce mitochondriálního metabolismu je velmi důležité, jelikož abnormality v tomto systému mohou vyvolat modifikaci oxidační homeostázy, což zvyšuje vývoj volných radikálů (Saravanan et al. 2005). Resveratrol i další látky působící skrze SIRT-1/PGC- $1\alpha$  dráhu mají do budoucna velký potenciál v oblasti neurodegenerativních poruch (Mudò et al. 2012). Tato zjištění silně naznačují, že resveratrol může mít neuroprotektivní účinky a také poskytují



mechanistický základ pro využití resveratrolu v klinické léčbě Parkinsonovy choroby a nejspíše i jiných neurologických poruch (Jin et al. 2008).



Obrázek 8 Mechanismy účinku resveratrolu na Alzheimerovu chorobu (převzato a upraveno z Komorowska et al. 2020)

### 3.6.4 Efekt resveratrolu na nádorová onemocnění

Vývoj rakoviny je vícestupňový proces začínající počátečními mutacemi (iniciace). Na tyto mutace následně navazuje propagace a progres, které nakonec vedou až ke zhoubnosti nádorů tzv. malignitě (Sirerol et al. 2016). Zejména během progresu resveratrol slouží jako chemopreventivní látka, a to takovým způsobem, že v průběhu této fáze interferuje s několika inhibičními mechanismy (například inhibice proliferace, inaktivace karcinogenu a další) (Choudhari et al. 2020). Resveratrol dokáže v různých typech rakovinných buněk indukovat cytoprotektivní a cytotoxickou autofagii, což by mohlo významně pomoci ke snížení toxicity a nežádoucích změn ve fyziologii u pacientů s rakovinou (Patra et al. 2020).

Harper et al. (2007) uvádí, že podávání resveratrolu brání rozvoji karcinomu prostaty. U myši léčených resveratrolem došlo k 87% poklesu špatně diferencovaných nádorů prostaty ve srovnání s kontrolami. Výsledky potvrzují hypotézu, že resveratrol reguluje proliferaci buněk, expresi receptorů pohlavních steroidů a specifický růstový faktor signalizující proteiny v prostatě (Harper et al. 2007). Další *in vivo* studie prováděná Sheth et al. (2012) na androgen necitlivých a vysoce agresivních lidských buňkách rakoviny prostaty (PC-3M-MM2)

je ve shodě s výsledky z předešlé studie. Léčba resveratrolem regulovala proliferaci buněk rakoviny prostaty indukci apoptózy a podstatně inhibovala invazi i migraci rakovinných buněk PC-3M-MM2. Sheth et al. (2012) uskutečnili experiment také na myším modelu s rakovinnými buňkami, který byl obohacen těžkou kombinovanou imunodeficiencí (SCID). Po 5 týdnech léčby resveratrolem (20 mg/kg) bylo pozorováno významné snížení výskytu nádoru prostaty a počtu plicních metastáz u SCID myši.

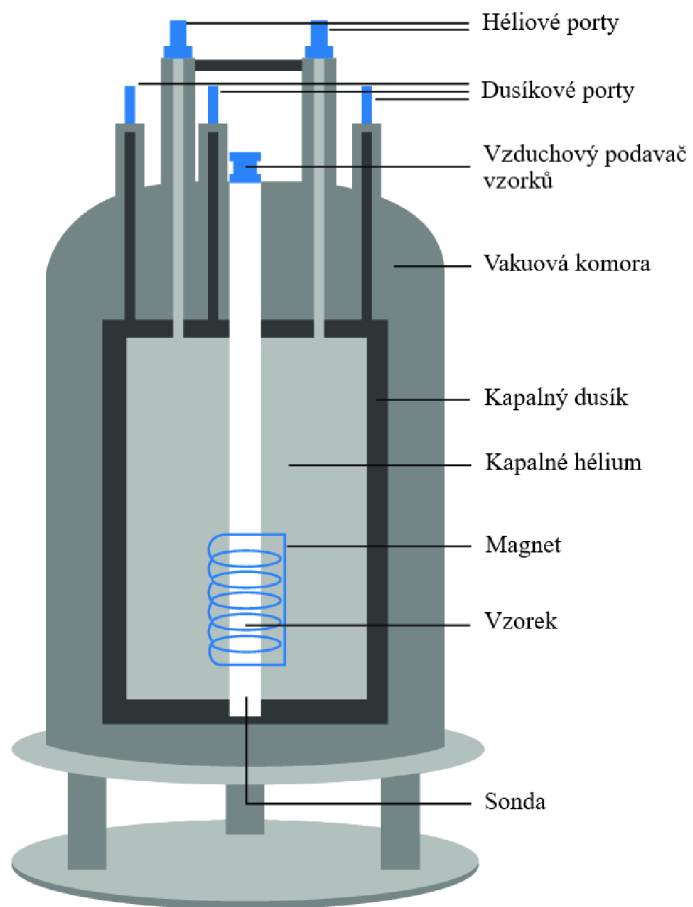
Resveratrol má s velkou pravděpodobností vliv i na kolorektální karcinom, který patří mezi nejčastější druhy rakoviny. Na incidenci a progresi kolorektálního karcinomu se podílí více procesů včetně oxidačního stresu, zánětu a apoptózy (Honari et al. 2019). Nutakul et al. (2011) pozorovali antikarcinogenní účinek u tří typů buněk kolorektálního karcinomu, jimiž jsou v této studii Caco-2, HCT-116 a HT-29. Tyto buňky mají různou agresivitu růstu, ale u všech tří typů buněk rakoviny tlustého střeva resveratrol dokázal významně snížit jejich schopnost vytvářet kolonie. Ukázalo se, že resveratrol svým působením také aktivuje dva klíčové proapoptotické proteiny (poly (ADP-ribóza) polymeráza a kaspáza-3) a tím indukuje apoptózu buněk. V další studii San Hipólito-Luengo et al. (2017) zkoumali vliv resveratrolu v různých koncentracích na buněčnou smrt a proliferaci buněk kolorektálního adenokarcinomu HT-29 a HCT-116. U buněk HT-29 byl při nižších koncentracích resveratrolu (1 a 10 mmol/l) pozorován nárůst buněk. Naopak při vyšší dávce (50 a 100 mmol/l) resveratrol snížil počet buněk a zvýšil procento apoptotických buněk. Nicméně u buněk HCT-116 nebyl pozorován žádný vliv resveratrolu jako tomu bylo například v předešlé studii. Celkově se zdá, že resveratrol je účinným nástrojem proti nádorům, ale je zapotřebí ho aplikovat ve vhodných koncentracích, aby se minimalizovaly nežádoucí účinky (San Hipólito-Luengo et al. 2017).

### 3.7 Nukleární magnetická rezonance

Nukleární magnetická rezonance (NMR, Obrázek č. 9) je jednou ze základních analytických metod, které se využívají v metabolomice. Mezi další hojně využívané metody patří plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem (GC-MS) a kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem (LC-MS). Často se kombinuje více technologických platforem dohromady, jelikož zatím neexistuje žádná analytická metoda, jež by dokázala provést úplnou identifikaci a kvantifikaci všech metabolitů (Emwas et al. 2019). Každá platforma má své výhody i nevýhody. NMR je 10krát až 100krát méně citlivé než MS, ale vykazuje lepší reprodukovatelnost, snadnější přípravu vzorků, a navíc má schopnost poskytovat strukturální a kvantitativní informace o metabolitech v celé řadě chemických tříd (Kim et al. 2018; Emwas et al. 2019).

Základy NMR spektroskopie jsou založeny na magnetických vlastnostech jader atomů, které lze využít k získání chemických informací (Günther 2013). Na rozdíl od většiny ostatních metabolomických metod NMR neslouží pouze pro analýzu tekutých vzorků, ale je vhodné i pro studium pevných nebo polotuhých vzorků (neporušené tkáně, orgány a další). Tato analytická metoda umožňuje výzkum molekul na atomové úrovni a vidět nejen atomy  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ , ale také biologicky reaktivní skupiny jako například  $^{31}\text{P}$  (Emwas et al. 2019). Ze zmíněných atomů je nejcitlivější  $^1\text{H}$ , který se v metabolomice využívá při tzv. jednodimenzionální (1D)  $^1\text{H}$  NMR analýze (Markley et al. 2017). I přesto, že je tato NMR analýza v metabolomice nejběžnější, má vážné nedostatky, které ztěžují kvantifikaci vzorků. Nejzávažnější nedostatek v kvantifikaci bývá u metabolitů s podobnou chemickou strukturou, jelikož se ve spektru objevují blízko sebe, což vede ke spektrálnímu překrytí (Crook & Powers 2020). Podle citlivosti lze dále za  $^1\text{H}$  zařadit  $^{31}\text{P}$ , jež je užitečný pro studium stavů buněčné energie *in vivo* a *ex vivo* (Markley et al. 2017). NMR se dále využívá k hledání jedinečných metabolitů (především metabolity vázané na proteiny) a měření některých anorganických metabolitů nebo iontů (kovové ionty a vodíkové kationty prostřednictvím pH), které nelze změřit prostřednictvím LC-MS a GC-MS

(Emwas et al. 2019). Díky stabilním izotopům lze NMR použít k celkovému prozkoumání metabolických cest včetně objasnění dynamiky a mechanismů přeměny jednotlivých metabolitů (Markley et al. 2017).



Obrázek 9 Zjednodušené schéma NMR spektrometru (převzato a přeloženo z Antcliffe & Gordon 2016)

## 4 Metodika

### 4.1 *In vitro* fekální fermentační systém

#### 4.1.1 Chemikálie

$\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (hydrogenuhličitan amonný),  $\text{NaHCO}_3$  (hydrogenuhličitan sodný),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (hydrogenfosforečnan sodný),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (dihydrogenfosforečnan draselný),  $\text{MgSO}_4$  (síran hořečnatý),  $\text{CaCl}_2$  (chlorid vápenatý),  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (tetrahydrát chloridu manganatého),  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (hexahydát chloridu kobaltnatého),  $\text{FeCl}_3$  (chlorid železitý), trypton, glukóza, maltóza, kvasnicový extrakt, vitamin  $\text{K}_1$ , hemin, resazurin, cystein hydrochlorid, 1M NaOH (hydroxid sodný),  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  (nonahydát síranu sodného), 6M HCl (kyselina chlorovodíková),  $\text{NaN}_3$  (azid sodný),  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$  (dimetylsulfoxid), zásobní roztok resveratrolu a plynný dusík.

#### 4.1.2 Fermentační médium

Fermentační médium bylo připraveno z 2,25 g tryptonu, 2,25 g glukózy, 1,125 g maltózy, 2,25 g kvasnicového extraktu, 50,7  $\mu\text{l}$  vitaminu  $\text{K}_1$  (0,5 mg/l metanolu), 5,07 mg heminu (5 mg/l) rozpuštěných v 450 ml destilované vody. Dále bylo přidáno 225 ml uhličitanového pufrovacího roztoku (4 g  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 35 g  $\text{NaHCO}_3$ , doplněné destilovanou vodou do objemu 1 l), 112,5  $\mu\text{l}$  mikromineralního roztoku (2,5 g  $\text{CaCl}_2$ , 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  $\text{FeCl}_3$ , 25 ml destilované vody), 225 ml makromineralního roztoku (5,7 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 6,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,3 g  $\text{MgSO}_4$ , doplněné destilovanou vodou do objemu 1 l) a 1,125 ml 0,1% resazurinového roztoku.

#### 4.1.3 Fosfátový pufr, redukční roztok

Fosfátový pufr byl vytvořen smícháním 390 ml 1/15M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a 610 ml 1/15M  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  (pH 7 při teplotě 20 °C). Redukční roztok byl připraven z 312,5 mg cystein hydrochloridu, 2 ml 1M NaOH, 101,5 mg  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  a 50 ml destilované vody.

#### 4.1.4 Odběr a příprava vzorků stolice

K analýze byly využity vzorky stolice, které byly získány od 20 zdravých dárců dvou věkových skupin (do 45 let a nad 70 let). Dárci neměli žádná dietní omezení, neužívali antibiotika ani netrpěli trávicími potížemi. Bližší informace o jednotlivých dárcích jsou vypsány v Tabulce č. 1. Odebrané vzorky byly uchovány v sáčcích, které byly uloženy v jednorázových sadách společně s anaerogenem (Biomérieux, Lyon, Francie). Následně bylo potřeba stolici zpracovat maximálně do 2 hodin od odběru. Vzorek stolice (24 g) byl společně s fosfátovým pufrem (75 ml) zhomogenizován ve stomacheru (Laboratory Blender, Stomacher® 400 Circulator, EU) za vzniku 24% suspenze. Nakonec byla vzniklá suspenze přefiltrována přes nylonový filtr.

Tabulka 1 Specifikace jednotlivých dárců

<b>Dárce</b>	<b>Pohlaví</b>	<b>Věk</b>	<b>BMI</b>
D01	Muž	12	16,22
D02	Muž	42	25,98
D03	Žena	80	24,74
D04	Žena	75	24,73
D05	Žena	76	25,78
D06	Muž	76	26,59
D07	Žena	75	24,02
D08	Muž	75	31,07
D09	Muž	45	21,55
D10	Žena	41	20,94
D11	Žena	28	24,46
D12	Muž	26	23,41
D13	Žena	30	22,86
D14	Žena	25	30,68
D15	Žena	32	28,65
D16	Žena	24	25,54
D17	Žena	70	28,13
D18	Muž	72	26,30
D19	Žena	74	27,85
D20	Muž	71	24,69

#### 4.1.5 Příprava 96-jamkových deep-well destiček

Fermentační medium a fosfátový pufr byly přibližně na 5–7 minut přivedeny k varu a následně schlazeny na 37 °C za stálého přívodu plynného dusíku. Pomocí 6M HCl bylo upraveno pH na hodnotu 7. Do 96-jamkových deep-well destiček bylo napipetováno 835 µl fermentačního média a 40 µl redukčního roztoku. Takto připravené destičky byly uchovány při 4 °C v anaerobní atmosféře do dalšího dne.

#### 4.1.6 Příprava roztoku resveratrolu

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

#### 4.1.7 Proces fermentace

Do destiček z předešlého dne bylo přidáno 100 µl fekální suspenze nebo fosfátového pufru v případě kontrol a 25 µl pracovního roztoku resveratrolu (finální koncentrace 50 µg/ml). Destičky byly zavakuovány s anaerogenem a umístěny do inkubátoru (37 °C, 100 rpm). V časech 0, 2, 4, 8 a 24 hodin bylo z každé jamky postupně odebráno 950 µl vzorku a smíseno s 50 µl azidu sodného (finální koncentrace NaN<sub>3</sub> ve vzorcích byla 1,5 mg/ml) v 1,5 ml mikrozkušavkách Eppendorf. Takto připravené vzorky byly skladovány při -80 °C až do konečné analýzy.

#### 4.1.8 Příprava vzorků pro NMR analýzu

Před analýzou byly vzorky rozmrazeny při pokojové teplotě, zhomogenizovány na vortexu a zcentrifugovány (4 °C, 15000 rpm, 10 min), abychom dosáhli oddělení pevné a kapalné fáze. Z centrifugovaných vzorků bylo odebráno 600 µl supernatantu do mikrozkušavek Eppendorf. Následně bylo přidáno 66,66 µl NMR pufru (1.5 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 1.5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4, 0.2 % NaN<sub>3</sub>, 5 mM kyselina trimethylsilylpropanová-TSP) a připravené vzorky byly opět zcentrifugovány (4 °C, 15000 rpm, 5 min). Z odstředěných vzorků bylo přepipetováno 600 µl supernatantu do NMR kyvet.

#### 4.1.9 Příprava vzorků pro UHPLC/Q-TOF analýzu

Před měřením vysokoúčinným kapalinovým chromatografem ve spojení s kvadrupólovým a průletovým analyzátozem (UHPLC/Q-TOF) byly vzorky rozmrazeny a zhomogenizovány na vortexu. Následně bylo ke 200 µl vzorku přidáno 200 µl metanolu, vzorek byl znovu zhomogenizován na vortexu a uložen na 24 hodin do -18 °C. Po uplynutí této doby byly vzorky přečištěny centrifugací (4 °C, 15000 rpm, 10 min). Poté bylo odebráno 50 µl supernatantu vzorku, k nimž bylo přidáno 900 µl rozpouštědla (voda a metanol, 1:1) a 50 µl vnitřního standardu (flukonazol 2 µg/ml). Společně se vzorky fermentací byly k měření připraveny i kalibrační roztoky vnitřního standardu v koncentracích: 20; 50; 100; 200; a 500 ng/ml. Dále byly připraveny slepé vzorky rozpouštědla (voda a metanol, 1:1).

#### 4.1.10 NMR analýza

Spektra byla změřena na spektrometru Bruker Avance III vybaveném broadband observation sondou (BBFO) SmartProbe s gradienty v ose Z (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Německo), který k práci využívá protonovou frekvenci 500,23 MHz. Teplota měření byla 298 K (25 °C). <sup>1</sup>H NMR spektra byla získána a zpracována za stejných podmínek. Pro potlačení signálu vody byla použita pulzní sekvence noesypr1d při 4,704 ppm. Pro každý vzorek byl použit jednodimenzionální <sup>1</sup>H experiment s následujícími parametry: počet skenů NS 128, počet datových bodů 32k při šířce spectra 16 ppm, relaxační prodleva 1 s, akviziční čas 4 s, směšovací čas 0,1 s. Ladění přístroje, kalibrace 90° pulzu a šimování byly optimalizovány automaticky pomocí standardních automatických rutin (atma, lock, rga, pulsecal a topshim). Signál volné precese (FID) byl před Fourierovou transformací 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.

#### 4.1.11 UHPLC/Q-TOF analýza

Analýza byla prováděna na systému UHPLC/MS sestávajícího z vysokoúčinného kapalinového chromatografu Dionex Ultimate 5000 (Thermo Fisher Scientific, USA) a hmotnostního analyzátoru typu kvadrupól Time-of-Flight (Q-TOF) s ultravysokým rozlišením a vysokou přesností stanovení molekulové hmotnosti (HRAM) IMPACT II (Bruker Daltonik, Německo). Pro chromatografickou separaci pomocí gradientové eluce byla použita kolona Acclaim RSLC 120 C18 column (2.2 µm, 2.1 × 100 mm, Thermo Fisher Scientific, USA) a kombinace mobilních fází 0,1% kyseliny mravenčí (roztok A) a metanolu (roztok B). Gradientová eluce začínala na 2% fáze B (0-1 min) a pokračovala na 100% B v 18 min s následným promýváním (do 22,5 min) a desetiminutovou ekvilibrací 2% A. Kolona byla temperována na 35 °C, průtok mobilní fáze byl nastaven na 250 µl/min. Objem nástřiku vzorku byl 5 µL. Vzorky byly měřeny pomocí ESI ionizace v pozitivním módu, spektra byla sbírána

při hmotnostním rozlišení více než 60 000 a skenovací frekvenci 1 Hz v hmotnostním rozsahu 60 – 1 500 m/z.

#### **4.1.12 Statistická analýza**

Statistická analýza byla provedena v programech Microsoft Excel a IBM SPSS Statistics 28. Data jsou vyjádřena jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka.

## 5 Výsledky

Výstupy z *in vitro* fermentace v 96-jamkových deep-well destičkách, které byly analyzované NMR a UHPLC/Q-TOF s ultravysokým rozlišením byly vyhodnocovány v programech Chenomx 8.5 a XCMS. Získaná data byla využita ke stanovení hlavních katabolitů resveratrolu a vyhodnocení vlivu resveratrolu na metabolom stolice u 20 dárců dvou věkových skupin. V první věkové skupině (A) byli zařazeni dárce ve věku do 45 let, v druhé věkové skupině (B) dárce nad 70 let. Počet dárců v obou skupinách se rovnal 10.

### 5.1 Analýza metodou UHPLC/Q-TOF

#### 5.1.1 Metabolismus resveratrolu

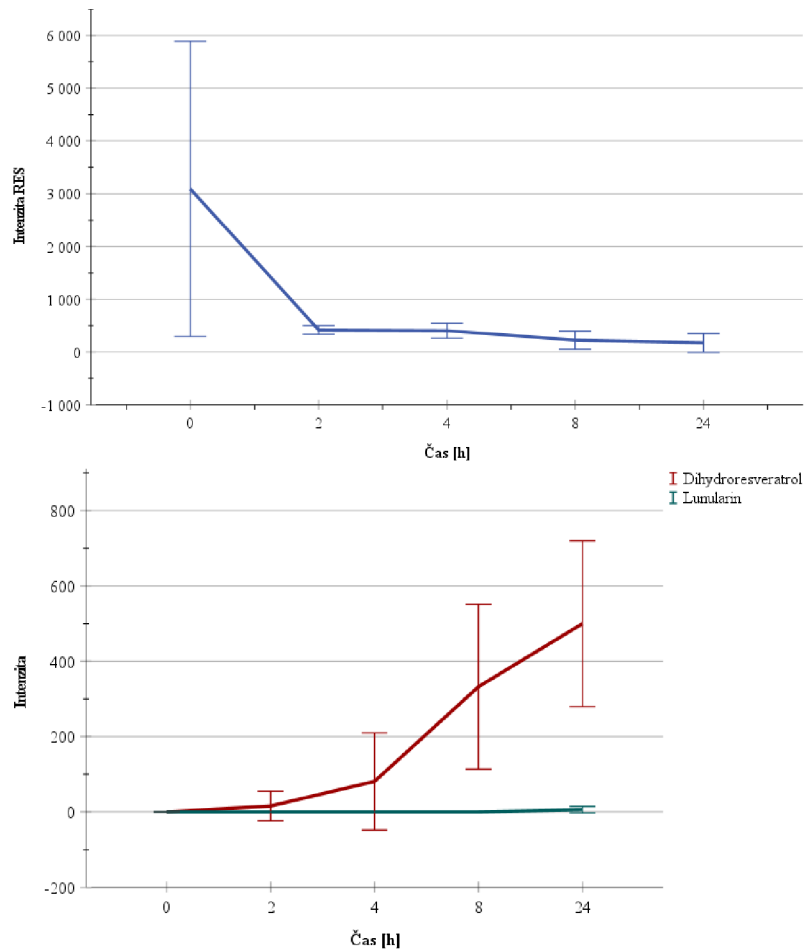
V analyzovaných vzorcích stolice byly cílenou analýzou nalezeny dva metabolity resveratrolu, kterými jsou dihydroresveratrol a 3,4'-dihydroxybibenzyl (lunularin) (Tabulka č. 2). Zatímco intenzita dihydroresveratrolu v čase rostla (procentuální navýšení intenzity dihydroresveratrolu mezi 2 h a 4 h – 80 %, mezi 4 h a 8 h – 76 %, mezi 8 h a 24 h – 33 %), intenzita výchozí látky resveratrolu v čase klesala (procentuální pokles intenzity resveratrolu mezi 0 h a 2 h – 86 %, mezi 0 h a 24 h – 94 %) (Obrázek č. 10). Odezva lunularinu nedosahovala tak vysokých hodnot jako u dihydroresveratrolu a vznikala pouze v čase 24 hodin. Na průměrné hodnoty resveratrolu a jeho dvou metabolitů byl aplikován dvouvýběrový T-test pro porovnání průměrů mezi skupinami muži a ženy a dále mezi skupinou staří a mladí. Z výsledků nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl.

Metabolismus resveratrolu se mezi jednotlivými dárce lišil jak v rychlosti, tak v míře rozkladu. Dihydroresveratrol byl produkován všemi dárce, ale existují velké interindividuální rozdíly, které jsou zobrazeny na Obrázku č. 11. Druhý metabolit, lunularin, byl nalezen u několika dárců převážně z věkové skupiny do 45 let. Celkově však převažovali neproducenti nad producenty. Počty producentů a neproducentů lunularinu jsou vypsány v Tabulce č. 3. Kromě rozdílu v produkci metabolitů byl u jednotlivých dárců zaznamenán také rozdíl v intenzitě odezvy resveratrolu v čase 0 h. Zjištěny byly dva případy buď intenzita resveratrolu nedosahovala ani 1000 nebo dosahovala hodnot v rozmezí 5 až 6,5 tisíc.

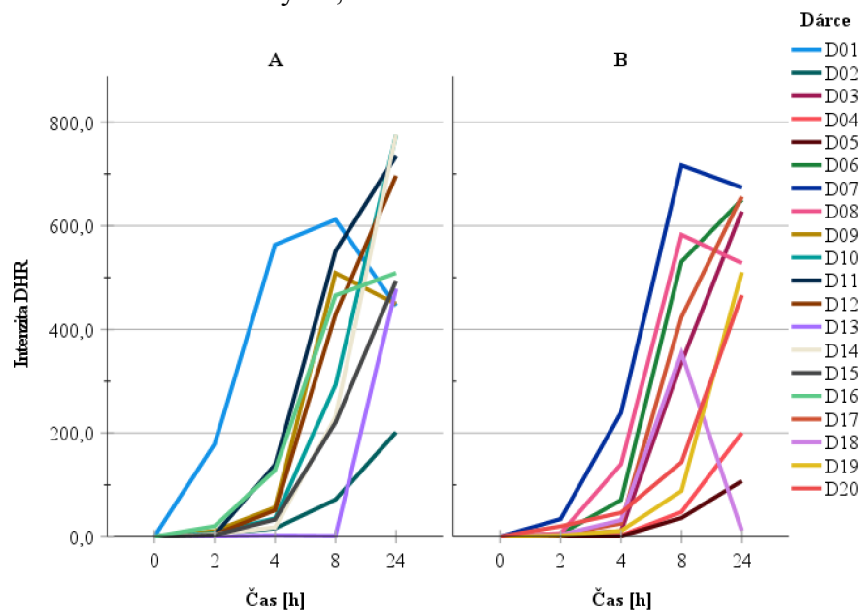
Tabulka 2 Seznam stilbenoidů pozorovaných a detekovaných ve vzorcích pomocí UHPLC/Q-TOF

Sledovaná látka	Sumární vzorec	Přesná hmota neutrální molekuly	Měřená [M+H] <sup>+</sup> přesná hmota	Retenční čas [min]
resveratrol	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	228,0786	229,0857	10,5
dihydroresveratrol	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	230,0943	231,1016	10,7
lunularin	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	214,0994	215,1065	13,1





Obrázek 10 Graf závislosti intenzity resveratrolu (RES), dihydroresveratrolu a lunularinu na čase; Intenzity získány metodou LC MS; Data jsou vyjádřena jako průměrná intenzita  $\pm$  směrodatná odchylka, N = 20



Obrázek 12 Graf závislosti intenzity dihydroresveratrolu (DHR) na čase podle jednotlivých dárců z věkové skupiny A a B, N = 20; věková skupina A zahrnuje dárcy do 45 let, věková skupina B zahrnuje dárcy nad 70 let

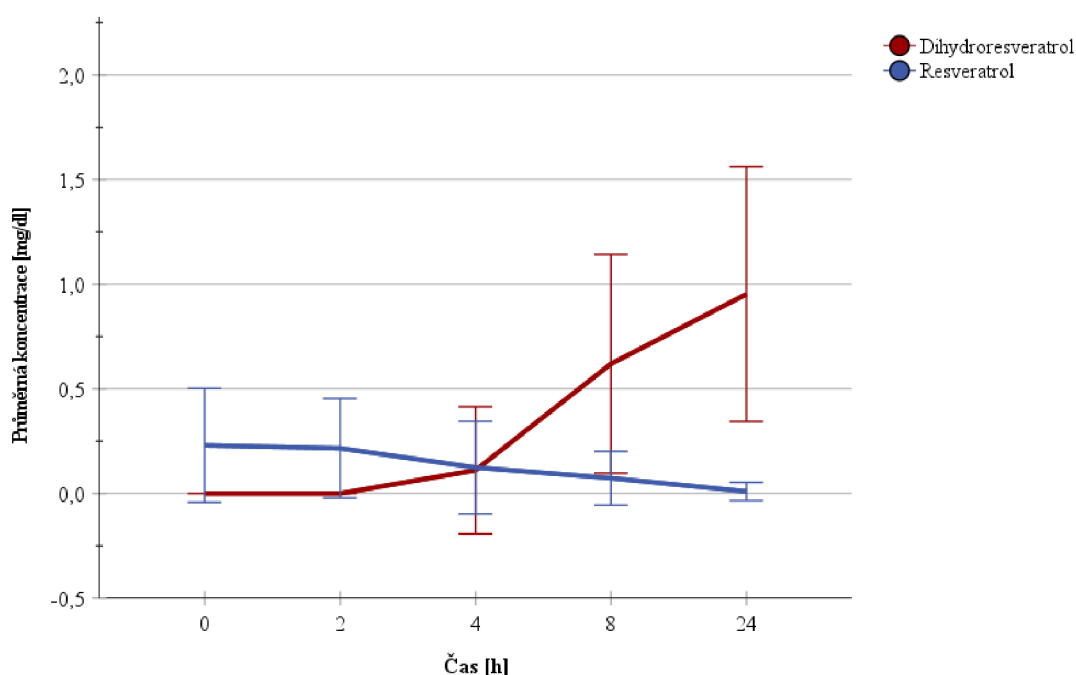
Tabulka 3 Počet producentů a neproducentů lunularinu; věková skupina A zahrnuje dárce do 45 let, věková skupina B zahrnuje dárce nad 70 let

LUNULARIN	producenti	neproducenti
počet z věkové skupiny A	6	4
počet z věkové skupiny B	3	7
celkový počet	9	11

## 5.2 Analýza metodou NMR

### 5.2.1 Metabolismus reveratrolu

Naměřená data z NMR analýzy byla vyhodnocena pomocí Chenomx 8.5. V analyzovaných vzorcích byl u všech dárců identifikován jediný metabolit resveratrolu, dihydroresveratrol. Data byla následně podrobena statistickému šetření. Byl proveden dvouvýběrový t-test průměrů mezi skupinami podle věku a dvouvýběrový t-test průměrů mezi skupinami podle pohlaví. U žádného z testů nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl. Na Obrázku č. 12 je zobrazena závislost průměrné koncentrace resveratrolu a dihydroresveratrolu na čase. Z grafického vyjádření je zřejmé, že koncentrace resveratrolu v čase klesá (v čase 24 hodin 0,01 mg/dl = 0,43 μmol/l), naopak koncentrace dihydroresveratrolu roste (v čase 24 hodin 0,95 mg/dl = 41,36 μmol/l).



Obrázek 13 Graf závislosti průměrné koncentrace resveratrolu a dihydroresveratrolu na čase. Koncentrace zjištěny metodou NMR. Data jsou vyjádřena jako průměrná koncentrace ± směrodatná odchylka, N=20.

## 5.2.2 Metabolom tlustého střeva

Díky výsledkům ze statistických analýz (párový t-test, dvouvýběrový t-test) bylo zjištěno, že přídavek resveratrolu ovlivnil složení střevního metabolomu. Souhrn všech sledovaných látek identifikovaných metodou NMR je vypsán v Tabulce č. 4. Párový t-test byl proveden pro porovnání průměrů všech identifikovaných látek mezi ošetřenou variantou resveratrole a kontrolou bez resveratrolu. V případě acetátu, butyrátu, izobutyrátu, propionátu, valerátu a izovalerátu byla v ošetřených variantách pozorována nižší průměrná koncentrace v čase než v kontrolách. Opačný případ nastal u glukózy a trehalózy, kdy byla v ošetřených variantách pozorována převážně vyšší průměrná koncentrace v čase než v kontrolách. Procentuální změny jsou vypsány v Tabulce č. 5.

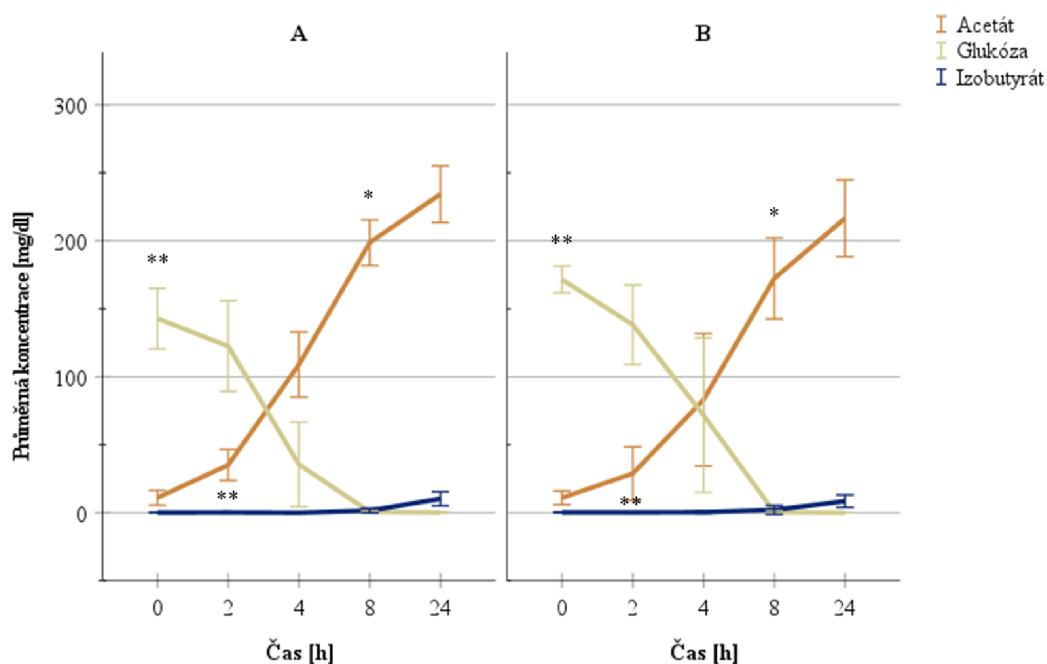
Tabulka 4 Souhrn sledovaných látek a výsledků ze statistických analýz, \*  $p < 0,05$ ; RES, vzorky ošetřené resveratrole; KON, vzorky bez ošetření resveratrole; N (staří) = 10, N (mladí) = 10; ↓↑ šipky znázorňují sníženou nebo zvýšenou průměrnou koncentraci sledované látky

Sledovaná látka	RES vs KON										staří vs mladí (KON)										staří vs mladí (RES)									
	RES					KON					staří					mladí					staří					mladí				
	0	2	4	8	24	0	2	4	8	24	0	2	4	8	24	0	2	4	8	24	0	2	4	8	24	0	2	4	8	24
Acetát	↓*	↓*	↓*	↓*	↓	↑*	↑*	↑*	↑*	↑*	↓	↓	↓	↓*	↓	↑	↑	↑	↑*	↑	↓	↓	↓	↓*	↓	↑	↑	↑	↑*	↑
Butyrát	↓*	↓*	↓*	↓*	↓	↑*	↑*	↑*	↑*	↑*	↓	↓	↓	↓*	↓	↑	↑	↑	↑*	↑	↓	↓	↓	↓*	↓	↑	↑	↑	↑*	↑
Glukóza	↓	↑*	↑*	↑	↓	↑	↓*	↓*	↓	↑											↑*	↑	↑			↓*	↓	↓		
Izobutyrá	↓	↓	↓*	↓	↓	↑	↑	↑*	↑	↑											↑	↑*	↑	↑	↓	↓	↓*	↓	↓	↑
Izovalerát	↓	↓*	↓*	↓*	↓	↑	↑*	↑*	↑*	↑																				
Maltóza																														
Propionát	↓	↓*	↓*	↓*	↑	↑	↑*	↑*	↑*	↓																				
Trehalóza	↓	↑*	↑	↓	↓	↑	↓*	↓	↑	↑	↓	↓	↑	↑*	↓	↑	↑	↓	↓*	↓										
Valerát	↓	↓*	↓*	↓*	↓	↑	↑*	↑*	↑*	↑																				

Tabulka 5 Procentuální vyjádření změn průměrných koncentrací sledovaných látek po přidání resveratrolu do vzorků; (-) vyjadřuje procentuální pokles, (+) vyjadřuje procentuální nárůst, (x) žádná změna

Sledovaná látka	Procentuální změna v ošetřené variantě ve srovnání s kontrolní variantou [%]				
	0	2	4	8	24
Acetát	-10,5	-19,48	-14,5	-3,04	-0,87
Butyrát	-20,8	-16,2	-16,2	-8,35	x
Glukóza	-1,1	+9,47	+47,4	+17,53	-45,05
Izobutyrá	-30,74	-28,21	-64,61	-43,69	-3,73
Izovalerát	-15,38	-10,76	-19,38	-19,4	-3,44
Propionát	-12,81	-20,44	-22,77	-9,42	+1,57
Trehalóza	-0,94	+6,22	+24,04	-71,93	-65,94
Valerát	-6,42	-28,64	-25,1	-12,42	-0,77

Dvouvýběrový t-test byl použit pro porovnání průměrů všech identifikovaných látek metodou NMR mezi věkovými skupinami. Test byl samostatně proveden pro ošetřenou variantu a kontrolu. Bylo zjištěno, že i bez přidání resveratrolu existuje statisticky významný rozdíl v průběhu metabolismu některých látek. Mladí lidé produkovali vyšší množství acetátu v čase, naopak u starších lidí existoval statisticky významně zvýšená koncentrace trehalózy v 8 hodině. V ošetřených variantách byl pozorován statisticky významný rozdíl mezi věkovými skupinami u acetátu, glukózy a izobutyřátu (Obrázek č. 13). Jako v předešlém případě byl acetát více produkován u mladých dárců. Průměrná koncentrace glukózy v čase byla vyšší u starších lidí a nejvýznamnější rozdíl byl zaznamenán v čase 0 h. U izobutyřátu byl statisticky významný rozdíl pozorován v čase 2 h, kdy jeho průměrná koncentrace u starší věkové skupiny začala pomalu růst.



Obrázek 15 Graf závislosti průměrných koncentrací ( $\pm$  směrodatná odchylka) acetátu, glukózy a izobutyřátu na čase mezi věkovými skupinami A a B v ošetřené variantě, N = 20, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01; věková skupina A zahrnuje dárce do 45 let, věková skupina B zahrnuje

## 6 Diskuze

Cílem této diplomové práce bylo stanovit hlavní katabolity resveratrolu v modelu tlustého střeva s využitím stolice dárců dvou věkových skupin (do 45 let a nad 70 let). Druhým cílem bylo zjistit, zda přídavek resveratrolu ovlivňuje střevní metabolom, případně jakým způsobem. Výsledky tohoto výzkumu potvrzují všechny stanovené hypotézy. Resveratrol je metabolizován mikrobiotou tlustého střeva, jeho přídavek ovlivňuje střevní metabolom a složení střevního metabolomu se mezi věkovými skupinami liší. Identifikace a pochopení rozdílů v lidském střevním metabolomu a metabolismu resveratrolu jsou důležitými kroky, které mohou pomoci v dalších výzkumech i klinické aplikaci resveratrolu.

Resveratrol má velmi nízkou biologickou dostupnost, která vykazuje vysokou interindividuální variabilitu. V této souvislosti bylo hledáno možné vysvětlení. Nunes et al. (2009) zjistili, že pohlaví a věk nemají přímý vliv na biologickou dostupnost resveratrolu. Později bylo zjištěno, že nízká biologická dostupnost je z velké části způsobena rozsáhlým mikrobiálním metabolismem v tlustém střevě. Střevní mikrobiota provádí biokonverzi resveratrolu, která může vést ke vzniku metabolitů s rozdílnou chemickou strukturou a biologickými vlastnostmi. Vzniklé metabolity se lépe vstřebávají a z tohoto důvodu jsou i biologicky dostupnější pro lidský organismus. Na základě těchto informací byla stanovena hypotéza, že metabolity mohou mít větší vliv na organismus než resveratrol v původní formě (Wenzel & Somoza 2005). Vzniklé metabolity mohou mít také úplně odlišné účinky než původní resveratrol a z tohoto důvodu jsou potřebné další výzkumy, které se budou zabývat touto problematikou.

V tomto výzkumu byl u všech dárců pozorován pokles koncentrace resveratrolu v čase. Avšak u některých vzorků fekálních kultur bylo v čase 0 hodin pozorováno, že koncentrace resveratrolu jsou nižší než aplikované množství. Tento jev může být způsoben adsorpcí resveratrolu na jiné složky stolice (například cukry) nebo na povrch přítomných mikroorganismů. Rozsah tohoto jevu byl závislý na použitých vzorcích stolice od jednotlivých dárců, ale nebyla nalezena žádná signifikantní souvislost s věkem ani pohlavím. Bode et al. (2013) uvádí obdobné výsledky. V čase 0 hodin byla taktéž pozorována nižší koncentrace *trans*-resveratrolu ve srovnání s aplikovanou dávkou (80  $\mu\text{mol/l}$ ).

Dle dat se podařilo nalézt a identifikovat dva katabolity resveratrolu, jimiž jsou dihydroresveratrol a 3,4'-dihydroxybibenzyl (lunularin). Tyto metabolity se shodují s publikovanými výsledky z dříve provedené studie od Bode et al. (2013). Ve většině studií však byl nalezen pouze dihydroresveratrol nebo glukuronidové a sulfátové konjugované formy resveratrolu (Jarosova et al. 2019; Zhang et al. 2021; Yao et al. 2022). Dihydroresveratrol vzniká hydrogenací dvojné vazby resveratrolu. Dle Jarosova et al. (2020) přítomnost jednoduché vazby v molekule dihydroresveratrolu umožňuje změny konfigurace, které ji mohou učinit více podobnou *cis* a *trans* izomerům resveratrolu. V *in vitro* studii na buněčných kulturách Caco-2, které simulují střevní epitel, bylo zkoumáno vstřebávání resveratrolu přes střevní stěnu. Bylo zjištěno, že dihydroresveratrol je schopný vstupovat do reakcí jako je glukuronidace a sulfatace, při kterých vznikají další katabolity (dihydroresveratrol-glukuronid, dihydroresveratrol-sulfát). Tyto reakce byly pravděpodobně způsobeny enzymy, které pochází ze střevního epitelu. V dalším experimentu by mohlo být

zajímavé se zaměřit na stabilitu dihydroresveratrolu a vznik výše zmíněných i dalších katabolitů. Tento experiment by byl vhodný zejména z toho důvodu, že i střevní mikrobiota produkuje enzymy (Bhushan et al. 2019), přičemž některé z nich by mohly katalyzací chemických reakcí umožnit vznik nových chemických látek.

V tomto výzkumu se dihydroresveratrol podařilo detekovat u všech 20 dárců jak pomocí NMR analýzy, tak pomocí UHPLC/Q-TOF analýzy. Vznik dihydroresveratrolu byl pozorován již v čase 2 h a intenzivní růst koncentrace byl pozorován od 4 do 24 h. Průměrná koncentrace dihydroresveratrolu po 24hodinové fermentaci vzorků, výrazně přesahovala průměrnou koncentraci resveratrolu na začátku experimentu v čase 0 hodin. Možným vysvětlením je již uvedená adsorpce resveratrolu na složky stolice.

Naopak lunularin byl identifikován pouze pomocí UHPLC/Q-TOF analýzy, pravděpodobně z důvodu vyšší citlivosti použité analytické metody. Lunularin celkově vznikl u 9 dárců (6 z věkové skupiny A, 3 z věkové skupiny B) a pouze v časovém bodě 24 h. Bode et al. (2013) uvádí, že lunularin může vznikat dvěma způsoby, buď dehydroxylací dihydroresveratrolu nebo redukcí *trans*-3,4'-dihydroxystilbenu. Tato informace by mohla vysvětlovat stav, proč byl lunularin nalezen pouze ve 24 hodině. Tím, že ve vzorcích byly ve 24 hodině detekovány vysoké koncentrace dihydroresveratrolu je pravděpodobné, že lunularin vznikl dehydroxylací dihydroresveratrolu při dosažení určité koncentrace nebo redukcí *trans*-3,4'-dihydroxystilbenu, který nebyl ve vzorcích nalezen. Pro potvrzení této hypotézy by bylo dobré prodloužit čas fermentace vzorků stolice a pozorovat další vývoj koncentrace lunularinu a dihydroresveratrolu v čase.

Ze zjištěných informací plyne, že dihydroresveratrol lze považovat za hlavní a nejčastěji vznikající metabolit resveratrolu. Nicméně mezi dárci existují velké interindividuální rozdíly v metabolismu resveratrolu a s tím související produkci jednotlivých metabolitů. Interindividuální rozdíly v průběhu katabolické reakce zaznamenali také Bode et al. (2013), Jarosova et al. (2019) a Yao et al. (2022). Možným vysvětlením je odlišné bakteriální zastoupení střevní mikrobioty ve vzorcích stolice jednotlivých dárců, jelikož tato skutečnost se může projevat právě tímto způsobem. Dle mého názoru by bylo v příštím experimentu vhodné provést identifikaci mikrobiálního zastoupení pomocí sekvenační analýzy 16S rRNA genů, která byla provedena i v jiných *in vitro* a *in vivo* studiích (Bode et al. 2013; Jaimes et al. 2019; Zhang et al. 2021; Yao et al. 2022).

Experiment byl zaměřen také na výzkum a porovnání metabolismu resveratrolu mezi dvěma věkovými skupinami (věková skupina A do 45 let, věková skupina B nad 70 let). Bylo zjištěno, že věk nemá statisticky významný vliv na metabolickou přeměnu resveratrolu. Avšak z důvodu výrazné změny ve složení střevní mikrobioty přibližně od 70 let věku byl výzkum zaměřen i na jiné látky střevního metabolomu (acetát, butyrát, glukózu, izobutyřát, izovalerát, maltózu, propionát, trehalózu a valerát). Metabolomika vzorků lidské stolice má velký potenciál získat informace o metabolických změnách, které doprovázejí stárnutí (Cui et al. 2021).

V této studii byl prokázán statisticky významný rozdíl ve výskytu mastných kyselin s krátkým řetězcem (acetát, butyrát, izobutyřát, izovalerát, propionát a valerát) v ošetřené a kontrolní variantě. Je známo, že mastné kyseliny s krátkým řetězcem jsou produkovány anaerobními střevními bakteriemi jako produkty fermentace sacharidů a hrají klíčovou roli v prevenci i léčbě některých onemocnění (metabolické a střevní poruchy, určité typy rakoviny

a další) (Patterson et al. 2014). Po přidání resveratrolu do vzorků byl ve srovnání s kontrolou pozorován u všech mastných kyselin s krátkým řetězcem pokles v koncentracích. To by mohlo nasvědčovat tomu, že resveratrol ovlivnil výskyt určitých bakterií, které jsou za produkci těchto látek zodpovědné. Etxeberria et al. (2015) ve své studii na myších taktéž zkoumali vliv resveratrolu na tyto látky. Nicméně suplementace *trans*-resveratrolu nevyvolala žádné změny v hladinách mastných kyselin s krátkým uhlíkatým řetězcem. Naopak ve studii od Ma et al. (2020) byl prokázán pozitivní efekt resveratrolu na obnovu střevní mikrobioty a s tím související produkci mastných kyselin s krátkým uhlíkatým řetězcem. Tyto výsledky neodpovídají těm z mého výzkumu a bylo by potřeba zjistit, zda nedošlo k statisticky významnému ovlivnění přítomných mikroorganismů ve vzorcích ještě jinou látkou. Avšak podobné výsledky získali Jacobs et al. (2008), kteří zaznamenali pokles koncentrace izobutyrátu po podání směsi hroznové šťávy a vinného extraktu. Předpokládají, že tento jev může souviset s polyfenolem indukovanou inhibicí fermentace proteinů, ze které pocházejí některé mastné kyseliny s krátkým řetězcem (izobutyrát, valerát, izovalerát). Za možný důvod považují také modulaci střevní mikrobioty.

Kromě statisticky významného rozdílu ve výskytu mastných kyselin s krátkým řetězcem v ošetřené a kontrolní variantě byl rozdíl pozorován i u glukózy a trehalózy. U obou sacharidů došlo po přidání resveratrolu ke zvýšení koncentrace. Vyšší koncentrace glukózy ve vzorcích by mohla souviset s redukcí glykolýzy v buňkách, kterou resveratrol vyvolává. Resveratrol podporuje snížení aktivity laktátdehydrogenázy a napodobuje účinky kalorické restrikce, čímž inhibuje absorpci glukózy a následně snižuje tvorbu laktátu. Všechny tyto metabolické změny vyvolané resveratrolem jsou spojeny s jeho protirakovinnou a protizánětlivou aktivitou (Torres Santiago et al. 2019). Další možnou příčinou zvýšení glukózy je dekonjugace glykosylovaných derivátů resveratrolu (příkladem je piceid), které vznikají činností *Bacillus cereus* (Jung et al. 2009). Pro potvrzení těchto hypotéz by bylo vhodné provést cílenou analýzu a kvantifikaci, aby bylo zjištěno, zda se ve vzorcích vyskytuje laktát a 3-O- $\beta$ -D-glukosid resveratrolu.

Pomocí dvouvýběrového t-testu byl zjištěn statisticky významný rozdíl v koncentracích acetátu, izobutyrátu a glukózy mezi věkovou skupinou A a věkovou skupinou B po přidání resveratrolu do vzorků stolice. Acetát byl více produkován ve vzorcích z mladší skupiny A, izobutyrát nejprve ve vzorcích ze starší skupiny B, ale od 8 hodiny došlo k intenzivnímu růstu koncentrace ve vzorcích od mladších dárců. Důvodem by mohlo být působení resveratrolu na střevní mikrobiotu, jejíž obsah i složení se v závislosti na věku dárců liší. Střevní mikrobiota u starších lidí (věk nad 70 let) je výrazně ovlivněna změnami ve stravovacích návycích a vstřebávání nutrientů, ale také snížením fyzické aktivity. Dochází například ke snížení počtu anaerobních bakterií z rodu *Bifidobacterium* a kmene Bacteroidetes nebo k nárůstu bakterií z rodu *Clostridium*, kmene Firmicutes a Proteobacteria (Monda et al. 2017; Rinninella et al. 2019).

V mém výzkumu byl u acetátu nalezen obdobný rozdíl mezi věkovými skupinami i bez přidání resveratrolu. Cui et al. (2021) zkoumali také vliv věku na profil lidských fekálních metabolitů. Zjistili, že mastné kyseliny s krátkým uhlíkatým řetězcem včetně acetátu, butyrátu, valerátu, izovalerátu a propionátu, stejně jako aminokyseliny (alanin, fenylalanin, valin, izoleucin, tyrosin a threonin) jsou nejdůležitějšími metabolity pro oddělení věkových tříd. Mastné kyseliny s krátkým uhlíkatým řetězcem více dominovaly ve fekálních profílech

mladých subjektů (věk 18 let), zatímco aminokyseliny byly ve větším množství ve skupině starších (věk 65–80 let). Výsledky mého experimentu související s mastnými kyselinami jsou ve shodě s provedeným experimentem od Cui et al. (2021), avšak ve zmíněné studii byl pozorován signifikantní rozdíl navíc u butyrátu. V dalším šetření by bylo zajímavé provést taktéž cílenou analýzu aminokyselin jak v ošetřené variantě resveratrolem, tak v kontrolních variantách.



## 7 Závěr

Resveratrol patří mezi nejvíce zkoumané stilbenoidy, kterému je připisována řada potenciálně prospěšných účinků na lidský organismus. Avšak k využití těchto vlastností je nejprve nutné pochopit procesy související s transformací resveratrolu při průchodu trávicím traktem, jelikož mají významný vliv na jeho biodostupnost. Tato diplomová práce byla zaměřena na sledování metabolismu resveratrolu a jeho vliv na střevní metabolom v *in vitro* modelu tlustého střeva s využitím stolice dárců ze dvou věkových skupin (věková skupina A do 45 let a věková skupina B nad 70 let).

Prvním cílem bylo stanovit jednotlivé katabolity resveratrolu, které vznikají jeho přeměnou v tlustém střevě. V tomto výzkumu byla potvrzena hypotéza, že resveratrol je transformován střevní mikrobiotou za vzniku dalších látek. Z výsledků bylo zjištěno, že střevní mikrobiota metabolizuje resveratrol na dihydroresveratrol a lunularin. Dihydroresveratrol byl detekován pomocí NMR analýzy i UHPLC/Q-TOF analýzy u všech dárců, ale existují velké interindividuální rozdíly v jeho produkci. Naopak lunularin se podařilo nalézt pouze kapalinovou chromatografií a vznikal u 9 dárců z 20. Dihydroresveratrol pravděpodobně vznikl hydrogenací dvojně vazby ethylenového můstku resveratrolu, lunularin dehydroxylací dihydroresveratrolu nebo redukcí *trans*-3,4'-dihydroxystilbenu. Získaná data neprokázala statisticky významný rozdíl v metabolismu resveratrolu mezi věkovými skupinami. Rozdíly v metabolismu resveratrolu mohly být zapříčiněny odlišným složením střevní mikrobioty. Proto by bylo vhodné, kdyby se v budoucím výzkumu provedla sekvenční analýza k identifikaci přítomných mikroorganismů.

Druhým cílem bylo vyhodnotit jakým způsobem přídavek resveratrolu ovlivní metabolom stolice. U mastných kyselin s krátkým uhlíkatým řetězcem (acetát, butyrát, propionát, valerát, izobutyřát a izovalerát), glukózy a trehalózy byl zjištěn statisticky významný rozdíl v koncentracích střevního metabolomu v ošetřené a kontrolní variantě. Dále byl zjištěn vliv věku na složení metabolomu jak po podání resveratrolu (rozdíl pozorován u acetátu, glukózy a izobutyřátu), tak v kontrolní variantě bez ohledu na resveratrol (rozdíl u acetátu a trehalózy).

Hypotézy této diplomové práce, že resveratrol bude mikrobiálně transformován, jeho přídavek ovlivní složení střevního metabolomu a složení střevního metabolomu se bude mezi dvěma sledovanými věkovými skupinami lišit, byly potvrzeny. Splněny byly taktéž všechny cíle diplomové práce.

## 8 Literatura

- Akinwumi B, Bordun K-A, Anderson H. 2018. Biological Activities of Stilbenoids. *International Journal of Molecular Sciences* **19**:792.
- Andrade S, Ramalho MJ, Pereira MDC, Loureiro JA. 2018. Resveratrol Brain Delivery for Neurological Disorders Prevention and Treatment. *Frontiers in Pharmacology* **9**:1–19. Available from <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2018.01261/full>.
- Benedetti F, Sorrenti V, Buriani A, Fortinguerra S, Scapagnini G, Zella D. 2020. Resveratrol, Rapamycin and Metformin as Modulators of Antiviral Pathways. *Viruses* **12**:1458.
- Bhatt JK, Thomas S, Nanjan MJ. 2012. Resveratrol supplementation improves glycemic control in type 2 diabetes mellitus. *Nutrition Research* **32**:537–541. Elsevier Inc. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0271531712001200>.
- Bhushan B, Singh BP, Saini K, Kumari M, Tomar SK, Mishra V. 2019. Role of microbes, metabolites and effector compounds in host–microbiota interaction: a pharmacological outlook. *Environmental Chemistry Letters* **17**:1801–1820. Springer International Publishing. Available from <http://link.springer.com/10.1007/s10311-019-00914-9>.
- Bode LM, Bunzel D, Huch M, Cho G-S, Ruhland D, Bunzel M, Bub A, Franz CM, Kulling SE. 2013. In vivo and in vitro metabolism of trans-resveratrol by human gut microbiota. *The American Journal of Clinical Nutrition* **97**:295–309. Available from <https://academic.oup.com/ajcn/article/97/2/295/4577012>.
- Bonnefont-Rousselot D. 2016. Resveratrol and Cardiovascular Diseases. *Nutrients* **8**:250. Available from <http://www.mdpi.com/2072-6643/8/5/250>.
- Brigante FI, Lucini Mas A, Pigni NB, Wunderlin DA, Baroni M V. 2020. Targeted metabolomics to assess the authenticity of bakery products containing chia, sesame and flax seeds. *Food Chemistry* **312**:126059. Elsevier.
- Brotons-Canto A, Gonzalez-Navarro CJ, Gurrea J, González-Ferrero C, Irache JM. 2020. Zein nanoparticles improve the oral bioavailability of resveratrol in humans. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **57**:101704. Elsevier.
- Castro-Moretti FR, Gentzel IN, Mackey D, Alonso AP. 2020. Metabolomics as an Emerging Tool for the Study of Plant–Pathogen Interactions. *Metabolites* **10**:52.
- Chaplin A, Carpené C, Mercader J. 2018. Resveratrol, Metabolic Syndrome, and Gut Microbiota. *Nutrients* **10**:1651.
- Choudhari AS, Mandave PC, Deshpande M, Ranjekar P, Prakash O. 2020. Phytochemicals in Cancer Treatment: From Preclinical Studies to Clinical Practice. *Frontiers in Pharmacology* **10**:1–18. Available from <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2019.01614/full>.
- Crook AA, Powers R. 2020. Quantitative NMR-Based Biomedical Metabolomics: Current Status and Applications. *Molecules* **25**:5128. Available from <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/21/5128>.
- Cui M, Trimigno A, Aru V, Rasmussen MA, Khakimov B, Engelsen SB. 2021. Influence of Age, Sex, and Diet on the Human Fecal Metabolome Investigated by <sup>1</sup>H NMR Spectroscopy. *Journal of Proteome Research* **20**:3642–3653. Available from <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jproteome.1c00220>.
- Damiani C, Gaglio D, Sacco E, Alberghina L, Vanoni M. 2020. Systems metabolomics: from metabolomic snapshots to design principles. *Current Opinion in Biotechnology* **63**:190–199. Elsevier Ltd.
- Dao T-MA et al. 2011. Resveratrol Increases Glucose Induced GLP-1 Secretion in Mice: A Mechanism which Contributes to the Glycemic Control. *PLoS ONE* **6**:e20700. Available from <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0020700>.

- Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, Knight R. 2010. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**:11971–11975.
- Dunn WB, Broadhurst DI, Atherton HJ, Goodacre R, Griffin JL. 2011. Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chem. Soc. Rev.* **40**:387–426.
- Dvorakova M, Landa P. 2017. Anti-inflammatory activity of natural stilbenoids: A review. *Pharmacological Research* **124**:126–145. Elsevier Ltd.
- El Khawand T, Courtois A, Valls J, Richard T, Krisa S. 2018. A review of dietary stilbenes: sources and bioavailability. *Phytochemistry Reviews* **17**:1007–1029.
- Emwas A-H et al. 2019. NMR Spectroscopy for Metabolomics Research. *Metabolites* **9**:123. Available from <https://www.mdpi.com/2218-1989/9/7/123>.
- Ettxeberria U, Arias N, Boqué N, Macarulla MT, Portillo MP, Martínez JA, Milagro FI. 2015. Reshaping faecal gut microbiota composition by the intake of trans-resveratrol and quercetin in high-fat sucrose diet-fed rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **26**:651–660. Elsevier Inc. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955286315000352>.
- Fabris S, Momo F, Ravagnan G, Stevanato R. 2008. Antioxidant properties of resveratrol and piceid on lipid peroxidation in micelles and monolamellar liposomes. *Biophysical Chemistry* **135**:76–83. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301462208000598>.
- Fan Y, Pedersen O. 2021. Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nature Reviews Microbiology* **19**:55–71. Springer US.
- Forouhi NG, Wareham NJ. 2019. Epidemiology of diabetes. *Medicine* **47**:22–27. Elsevier Ltd. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357303918302640>.
- Gibson GG, Skett P. 1986. *Introduction to Drug Metabolism*. Springer US, Boston, MA.
- Günther H. 2013. *NMR Spectroscopy: Basic Principles, Concepts and Applications in Chemistry*, 3rd edition. John Wiley & Sons. Available from <https://books.google.cz/books?id=uVN0AgAAQBAJ>.
- Harper CE, Patel BB, Wang J, Arabshahi A, Eltoum IA, Lamartiniere CA. 2007. Resveratrol suppresses prostate cancer progression in transgenic mice. *Carcinogenesis* **28**:1946–1953. Available from <https://academic.oup.com/carcin/article-lookup/doi/10.1093/carcin/bgm144>.
- Hatzakis E. 2019. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy in Food Science: A Comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **18**:189–220.
- Honari M, Shafabakhsh R, Reiter RJ, Mirzaei H, Asemi Z. 2019. Resveratrol is a promising agent for colorectal cancer prevention and treatment: focus on molecular mechanisms. *Cancer Cell International* **19**:180. BioMed Central. Available from <https://cancerci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12935-019-0906-y>.
- Hong J, Yang L, Zhang D, Shi J. 2016. Plant Metabolomics: An Indispensable System Biology Tool for Plant Science. *International Journal of Molecular Sciences* **17**:767.
- Hoseini A, Namazi G, Farrokhian A, Reiner Ž, Aghadavod E, Bahmani F, Asemi Z. 2019. The effects of resveratrol on metabolic status in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary heart disease. *Food & Function* **10**:6042–6051. Available from <http://xlink.rsc.org/?DOI=C9FO01075K>.
- Jacobs DM, Deltimple N, van Velzen E, van Dorsten FA, Bingham M, Vaughan EE, van Duynhoven J. 2008. <sup>1</sup>H NMR metabolite profiling of feces as a tool to assess the impact

- of nutrition on the human microbiome. *NMR in Biomedicine* **21**:615–626. Available from <http://doi.wiley.com/10.1002/nbm.1233>.
- Jaimes J, Jarosova V, Vesely O, Mekadim C, Mrazek J, Marsik P, Killer J, Smejkal K, Kloucek P, Havlik J. 2019. Effect of Selected Stilbenoids on Human Fecal Microbiota. *Molecules* **24**:744. Available from <http://www.mdpi.com/1420-3049/24/4/744>.
- Jandhyala SM. 2015. Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology* **21**:8787.
- Jarosova V, Vesely O, Duskocil I, Tomisova K, Marsik P, Jaimes JD, Smejkal K, Kloucek P, Havlik J. 2020. Metabolism of cis- and trans-Resveratrol and Dihydroresveratrol in an Intestinal Epithelial Model. *Nutrients* **12**:595. Available from <https://www.mdpi.com/2072-6643/12/3/595>.
- Jarosova V, Vesely O, Marsik P, Jaimes J, Smejkal K, Kloucek P, Havlik J. 2019. Metabolism of Stilbenoids by Human Faecal Microbiota. *Molecules* **24**:1155. Available from <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/6/1155>.
- Jeyaraman MM, Al-Yousif NSH, Singh Mann A, Dolinsky VW, Rabbani R, Zarychanski R, Abou-Setta AM. 2020. Resveratrol for adults with type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database of Systematic Reviews* **2020**. Available from <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD011919.pub2>.
- Jin F, Wu Q, Lu Y-F, Gong Q-H, Shi J-S. 2008. Neuroprotective effect of resveratrol on 6-OHDA-induced Parkinson's disease in rats. *European Journal of Pharmacology* **600**:78–82. Elsevier B.V. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014299908010248>.
- Jin Q, Black A, Kales SN, Vattam D, Ruiz-Canela M, Sotos-Prieto M. 2019. Metabolomics and microbiomes as potential tools to evaluate the effects of the mediterranean diet. *Nutrients* **11**:1–27.
- Jung CM, Heinze TM, Schnackenberg LK, Mullis LB, Elkins SA, Elkins CA, Steele RS, Sutherland JB. 2009. Interaction of dietary resveratrol with animal-associated bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **297**:266–273. Available from <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.2009.01691.x>.
- Kim HK, Kostidis S, Choi YH. 2018. NMR Analysis of Fecal Samples. Pages 317–328 *Microbial Metabolomics: Methods and Protocols*. Available from [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7592-1\\_24](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7592-1_24).
- Komorowska J, Wątroba M, Szukiewicz D. 2020. Review of beneficial effects of resveratrol in neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease. *Advances in Medical Sciences* **65**:415–423. Elsevier. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1896112620300341>.
- Kong D et al. 2020. Pulmonary administration of resveratrol/hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex: in vivo disposition and in vitro metabolic study. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **60**:101995. Elsevier B.V.
- Kopp P. 1998. Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the “French paradox”? *European Journal of Endocrinology* **138**:619–620.
- Krawczyk H. 2019. The stilbene derivatives, nucleosides, and nucleosides modified by stilbene derivatives. *Bioorganic Chemistry* **90**:103073. Elsevier.
- la Reau AJ, Suen G. 2018. The Ruminococci: key symbionts of the gut ecosystem. *Journal of Microbiology* **56**:199–208. Available from <http://link.springer.com/10.1007/s12275-018-8024-4>.
- Leylabadlo HE et al. 2020. The critical role of *Faecalibacterium prausnitzii* in human health: An overview. *Microbial Pathogenesis* **149**:104344. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401020307105>.

- Li S, Tian Y, Jiang P, Lin Y, Liu X, Yang H. 2021. Recent advances in the application of metabolomics for food safety control and food quality analyses. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **61**:1448–1469. Taylor & Francis.
- Liu X, Locasale JW. 2017. Metabolomics: A Primer. *Trends in Biochemical Sciences* **42**:274–284. Elsevier Ltd. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096800041730018X>.
- Liu Y, Liang X, Zou Y, Peng Y, McClements DJ, Hu K. 2020. Resveratrol-loaded biopolymer core-shell nanoparticles: bioavailability and anti-inflammatory effects. *Food & Function* **11**:4014–4025. Royal Society of Chemistry.
- Luca SV, Macovei I, Bujor A, Miron A, Skalicka-Woźniak K, Aprotosoai AC, Trifan A. 2019. Bioactivity of dietary polyphenols: The role of metabolites. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **0**:1–34. Taylor & Francis. Available from <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.2018.1546669>.
- Lynch S V., Pedersen O. 2016. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *New England Journal of Medicine* **375**:2369–2379.
- Ma Y, Liu S, Shu H, Crawford J, Xing Y, Tao F. 2020. Resveratrol alleviates temporomandibular joint inflammatory pain by recovering disturbed gut microbiota. *Brain, Behavior, and Immunity* **87**:455–464. Elsevier. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889159119312991>.
- Makarewicz M, Drożdż I, Tarko T, Duda-Chodak A. 2021. The Interactions between Polyphenols and Microorganisms, Especially Gut Microbiota. *Antioxidants* **10**:188. Available from <https://www.mdpi.com/2076-3921/10/2/188>.
- Mankowski RT, You L, Buford TW, Leeuwenburgh C, Manini TM, Schneider S, Qiu P, Anton SD. 2020. Higher dose of resveratrol elevated cardiovascular disease risk biomarker levels in overweight older adults – A pilot study. *Experimental Gerontology* **131**:110821. Elsevier. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S053155651930539X>.
- Markley JL, Brüschweiler R, Edison AS, Eghbalnia HR, Powers R, Raftery D, Wishart DS. 2017. The future of NMR-based metabolomics. *Current Opinion in Biotechnology* **43**:34–40. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166916301768>.
- Marques BCAA, Trindade M, Aquino JCF, Cunha AR, Gismondi RO, Neves MF, Oigman W. 2018. Beneficial effects of acute trans-resveratrol supplementation in treated hypertensive patients with endothelial dysfunction. *Clinical and Experimental Hypertension* **40**:218–223. Taylor & Francis. Available from <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10641963.2017.1288741>.
- Medrano-Padial C, Prieto AI, Puerto M, Pichardo S. 2021. In vitro assessment of the mutagenic and genotoxic potential of a pure stilbene extract. *Food and Chemical Toxicology* **150**:112065. Elsevier Ltd.
- Mendis S, Puska P, Norrving B. 2011. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. World Health Organization. Available from <https://world-heart-federation.org/resource/global-atlas-cvd-prevention-control/>.
- Milton-Laskibar I, Marcos-Zambrano LJ, Gómez-Zorita S, Fernández-Quintela A, Carrillo de Santa Pau E, Martínez JA, Portillo MP. 2021. Gut Microbiota Induced by Pterostilbene and Resveratrol in High-Fat-High-Fructose Fed Rats: Putative Role in Steatohepatitis Onset. *Nutrients* **13**:1738. Available from <https://www.mdpi.com/2072-6643/13/5/1738>.
- Monda V et al. 2017. Exercise Modifies the Gut Microbiota with Positive Health Effects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2017**:1–8. Available from <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2017/3831972/>.
- Mudò G et al. 2012. Transgenic expression and activation of PGC-1 $\alpha$  protect dopaminergic neurons in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Cellular and Molecular Life*

- Sciences **69**:1153–1165. Available from <http://link.springer.com/10.1007/s00018-011-0850-z>.
- Nanjan MJ, Betz J. 2010. Resveratrol for the Management of Diabetes and its Downstream Pathologies. *European Endocrinology* **10**:31. Available from <http://www.touchendocrinology.com/articles/resveratrol-management-diabetes-and-its-downstream-pathologies>.
- Nunes T, Almeida L, Rocha J-F, Falcão A, Fernandes-Lopes C, Loureiro AI, Wright L, Vaz-da-Silva M, Soares-da-Silva P. 2009. Pharmacokinetics of Trans -resveratrol Following Repeated Administration in Healthy Elderly and Young Subjects. *The Journal of Clinical Pharmacology* **49**:1477–1482. Available from <http://doi.wiley.com/10.1177/0091270009339191>.
- Nutakul W, Sobers HS, Qiu P, Dong P, Decker EA, McClements DJ, Xiao H. 2011. Inhibitory Effects of Resveratrol and Pterostilbene on Human Colon Cancer Cells: A Side-by-Side Comparison. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**:10964–10970. Available from <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf202846b>.
- Pasquereau S, Nehme Z, Haidar Ahmad S, Daouad F, Van Assche J, Wallet C, Schwartz C, Rohr O, Morot-Bizot S, Herbein G. 2021. Resveratrol Inhibits HCoV-229E and SARS-CoV-2 Coronavirus Replication In Vitro. *Viruses* **13**:354.
- Patra S, Mishra SR, Behera BP, Mahapatra KK, Panigrahi DP, Bhol CS, Praharaj PP, Sethi G, Patra SK, Bhutia SK. 2020. Autophagy-modulating phytochemicals in cancer therapeutics: Current evidences and future perspectives. *Seminars in Cancer Biology* DOI: 10.1016/j.semcancer.2020.05.008. Elsevier Ltd. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1044579X20301048>.
- Patterson E, Cryan JF, Fitzgerald GF, Ross RP, Dinan TG, Stanton C. 2014. Gut microbiota, the pharmabiotics they produce and host health. *Proceedings of the Nutrition Society* **73**:477–489. Available from [https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0029665114001426/type/journal\\_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0029665114001426/type/journal_article).
- Paulo L, Ferreira S, Gallardo E, Queiroz JA, Domingues F. 2010. Antimicrobial activity and effects of resveratrol on human pathogenic bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **26**:1533–1538.
- Pinu FR, Goldansaz SA, Jaine J. 2019. Translational Metabolomics: Current Challenges and Future Opportunities. *Metabolites* **9**:108.
- Poulose SM, Thangthaeng N, Miller MG, Shukitt-Hale B. 2015. Effects of pterostilbene and resveratrol on brain and behavior. *Neurochemistry International* **89**:227–233. Elsevier Ltd.
- Qiao Y, Sun J, Xia S, Tang X, Shi Y, Le G. 2014. Effects of resveratrol on gut microbiota and fat storage in a mouse model with high-fat-induced obesity. *Food and Function* **5**:1241–1249.
- R. Neves A, Lucio M, L.C. Lima J, Reis S. 2012. Resveratrol in Medicinal Chemistry: A Critical Review of its Pharmacokinetics, Drug-Delivery, and Membrane Interactions. *Current Medicinal Chemistry* **19**:1663–1681.
- Ramírez-Garza S, Laveriano-Santos E, Marhuenda-Muñoz M, Storniolo C, Tresserra-Rimbau A, Vallverdú-Queralt A, Lamuela-Raventós R. 2018a. Health Effects of Resveratrol: Results from Human Intervention Trials. *Nutrients* **10**:1892. Available from <http://www.mdpi.com/2072-6643/10/12/1892>.
- Ramírez-Garza S, Laveriano-Santos E, Marhuenda-Muñoz M, Storniolo C, Tresserra-Rimbau A, Vallverdú-Queralt A, Lamuela-Raventós R. 2018b. Health Effects of Resveratrol: Results from Human Intervention Trials. *Nutrients* **10**:1892. Available from <http://www.mdpi.com/2072-6643/10/12/1892>.

- Reinisalo M, Kårlund A, Koskela A, Kaarniranta K, Karjalainen RO. 2015. Polyphenol Stilbenes: Molecular Mechanisms of Defence against Oxidative Stress and Aging-Related Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2015**:1–24.
- Renaud S, de Lorgeril M. 1992. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet* **339**:1523–1526.
- Riccio BVF, Spósito L, Carvalho GC, Ferrari PC, Chorilli M. 2020. Resveratrol isoforms and conjugates: A review from biosynthesis in plants to elimination from the human body. *Archiv der Pharmazie* **353**:2000146.
- Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Miggianno G, Gasbarrini A, Mele M. 2019. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms* **7**:14. Available from <http://www.mdpi.com/2076-2607/7/1/14>.
- Rivière C, Pawlus AD, Mérillon J-M. 2012. Natural stilbenoids: distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in Vitaceae. *Natural Product Reports* **29**:1317.
- Roberts MS, Magnusson BM, Burczynski FJ, Weiss M. 2002. Enterohepatic Circulation. *Clinical Pharmacokinetics* **41**:751–790. Available from <http://link.springer.com/10.2165/00003088-200241100-00005>.
- Rowland I, Gibson G, Heinken A, Scott K, Swann J, Thiele I, Tuohy K. 2018. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *European journal of nutrition* **57**:1–24. Springer Berlin Heidelberg. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28393285> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5847071>.
- Saad NM, Sekar M, Gan SH, Lum PT, Vaijanathappa J, Ravi S. 2020. Resveratrol: Latest Scientific Evidences of its Chemical, Biological Activities and Therapeutic Potentials. *Pharmacognosy Journal* **12**:1779–1791. Available from <http://www.phcogj.com/article/1292>.
- Salehi B, Mishra A, Nigam M, Sener B, Kilic M, Sharifi-Rad M, Fokou P, Martins N, Sharifi-Rad J. 2018. Resveratrol: A Double-Edged Sword in Health Benefits. *Biomedicines* **6**:91. Available from <http://www.mdpi.com/2227-9059/6/3/91>.
- San Hipólito-Luengo A, Alcaide A, Ramos-González M, Cercas E, Vallejo S, Romero A, Talero E, Sánchez-Ferrer CF, Motilva V, Peiró C. 2017. Dual Effects of Resveratrol on Cell Death and Proliferation of Colon Cancer Cells. *Nutrition and Cancer* **69**:1019–1027. Taylor & Francis. Available from <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01635581.2017.1359309>.
- Saravanan KS, Sindhu KM, Mohanakumar KP. 2005. Acute intranigral infusion of rotenone in rats causes progressive biochemical lesions in the striatum similar to Parkinson's disease. *Brain Research* **1049**:147–155. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006899305006372>.
- Seyed Hameed AS, Rawat PS, Meng X, Liu W. 2020. Biotransformation of dietary phytoestrogens by gut microbes: A review on bidirectional interaction between phytoestrogen metabolism and gut microbiota. *Biotechnology Advances* **43**:107576. Elsevier Inc. Available from <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107576>.
- Shen T, Wang X-N, Lou H-X. 2009. Natural stilbenes: an overview. *Natural Product Reports* **26**:916.
- Sheth S, Jajoo S, Kaur T, Mukherjea D, Sheehan K, Rybak LP, Ramkumar V. 2012. Resveratrol Reduces Prostate Cancer Growth and Metastasis by Inhibiting the Akt/MicroRNA-21 Pathway. *PLoS ONE* **7**:e51655. Available from <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0051655>.

- Sirerol JA, Rodríguez ML, Mena S, Asensi MA, Estrela JM, Ortega AL. 2016. Role of Natural Stilbenes in the Prevention of Cancer. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2016**:1–15. Available from <http://www.hindawi.com/journals/omcl/2016/3128951/>.
- Springer M, Moco S. 2019. Resveratrol and Its Human Metabolites—Effects on Metabolic Health and Obesity. *Nutrients* **11**:143.
- Stevens JF, Maier CS. 2016. The chemistry of gut microbial metabolism of polyphenols. *Phytochemistry Reviews* **15**:425–444. Springer Netherlands.
- Tellone E, Galtieri A, Russo A, Giardina B, Ficarra S. 2015. Resveratrol: A Focus on Several Neurodegenerative Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2015**:1–14. Available from <http://www.hindawi.com/journals/omcl/2015/392169/>.
- Tian B, Liu J. 2020. Resveratrol: a review of plant sources, synthesis, stability, modification and food application. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **100**:1392–1404.
- Timmers S et al. 2016. Resveratrol as Add-on Therapy in Subjects With Well-Controlled Type 2 Diabetes: A Randomized Controlled Trial. *Diabetes Care* **39**:2211–2217. Available from <http://care.diabetesjournals.org/lookup/doi/10.2337/dc16-0499>.
- Torres Santiago G, Serrano Contreras JI, Meléndez Camargo ME, Zepeda Vallejo LG. 2019. NMR-based metabonomic approach reveals changes in the urinary and fecal metabolome caused by resveratrol. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **162**:234–241. Elsevier B.V. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708518312779>.
- Tuohy KM, Scott KP. 2015. The Microbiota of the Human Gastrointestinal Tract. Pages 1–15 *Diet-Microbe Interactions in the Gut*. Elsevier.
- Turner RS et al. 2015. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of resveratrol for Alzheimer disease. *Neurology* **85**:1383–91. Available from <http://www.neurology.org/lookup/doi/10.1212/WNL.0000000000002035>.
- Valdés L, Cuervo A, Salazar N, Ruas-Madiedo P, Gueimonde M, González S. 2015. The relationship between phenolic compounds from diet and microbiota: Impact on human health. *Food and Function* **6**:2424–2439. Royal Society of Chemistry.
- van Duynhoven J et al. 2011. Metabolic fate of polyphenols in the human superorganism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**:4531–4538.
- Wang P et al. 2020. Resveratrol reduces obesity in high-fat diet-fed mice via modulating the composition and metabolic function of the gut microbiota. *Free Radical Biology and Medicine* **156**:83–98. Elsevier B.V. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584920303774>.
- Wang P, Sang S. 2018. Metabolism and pharmacokinetics of resveratrol and pterostilbene. *BioFactors* **44**:16–25.
- Wenzel E, Somoza V. 2005. Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Molecular Nutrition & Food Research* **49**:472–481. Available from <http://doi.wiley.com/10.1002/mnfr.200500010>.
- Wong RHX, Howe PRC, Buckley JD, Coates AM, Kunz I, Berry NM. 2011. Acute resveratrol supplementation improves flow-mediated dilatation in overweight/obese individuals with mildly elevated blood pressure. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* **21**:851–856. Elsevier Ltd. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939475310000785>.
- Yang N-C, Lee C-H, Song T-Y. 2010. Evaluation of Resveratrol Oxidation in Vitro and the Crucial Role of Bicarbonate Ions. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **74**:63–68. Available from <https://academic.oup.com/bbb/article/74/1/63-68/5949709>.
- Yao M, Fei Y, Zhang S, Qiu B, Zhu L, Li F, Berglund B, Xiao H, Li L. 2022. Gut Microbiota Composition in Relation to the Metabolism of Oral Administrated Resveratrol. *Nutrients* **14**:1013. Available from <https://www.mdpi.com/2072-6643/14/5/1013>.



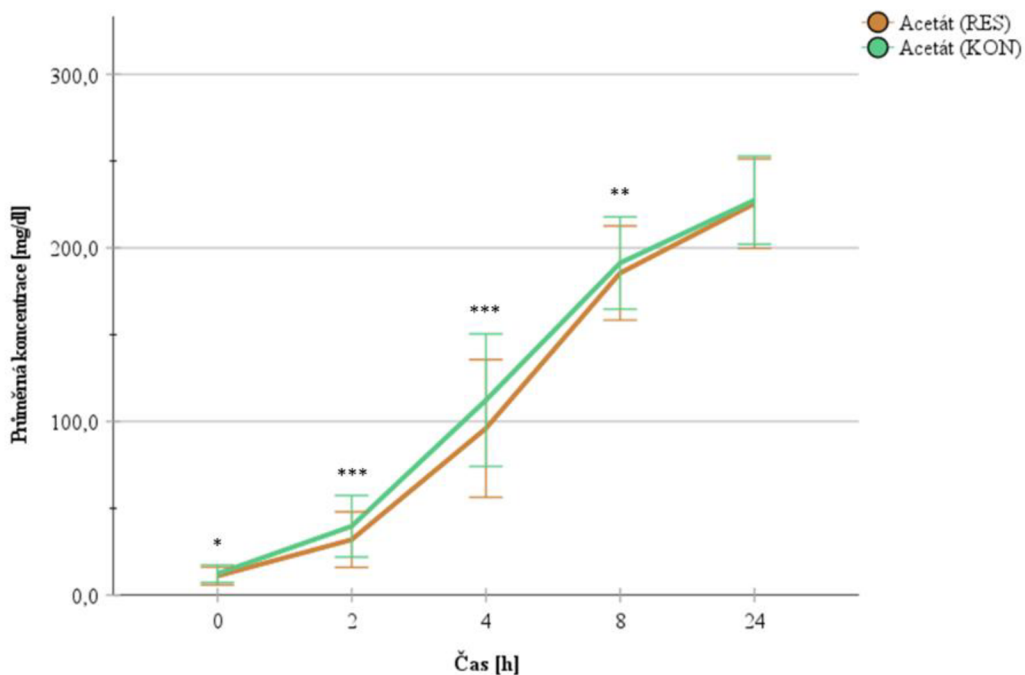
- Yin X, Liao W, Li Q, Zhang H, Liu Z, Zheng X, Zheng L, Feng X. 2020. Interactions between resveratrol and gut microbiota affect the development of hepatic steatosis: A fecal microbiota transplantation study in high-fat diet mice. *Journal of Functional Foods* **67**:103883. Elsevier. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464620301079>.
- Zhang B, Xu Y, Lv H, Pang W, Wang J, Ma H, Wang S. 2021. Intestinal pharmacokinetics of resveratrol and regulatory effects of resveratrol metabolites on gut barrier and gut microbiota. *Food Chemistry* **357**:129532. Elsevier Ltd. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814621005380>.
- Zhang L, Yu X, Ji M, Liu S, Wu X, Wang Y, Liu R. 2018. Resveratrol alleviates motor and cognitive deficits and neuropathology in the A53T  $\alpha$ -synuclein mouse model of Parkinson's disease. *Food & Function* **9**:6414–6426. Royal Society of Chemistry. Available from <http://xlink.rsc.org/?DOI=C8FO00964C>.
- Zhao X, Tao J, Zhang T, Jiang S, Wei W, Han H, Shao Y, Zhou G, Yue H. 2019. Resveratrol Alleviates Postprandial Hyperglycemia in Diabetic Mice by Competitively Inhibiting  $\alpha$ -Glucosidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **67**:2886–2893. American Chemical Society. Available from <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.9b00455>.
- Zhao Y, Shi M, Ye J-H, Zheng X-Q, Lu J-L, Liang Y-R. 2015. Photo-induced chemical reaction of trans-resveratrol. *Food Chemistry* **171**:137–143. Elsevier Ltd.
- Zupančič Š, Lavrič Z, Kristl J. 2015. Stability and solubility of trans-resveratrol are strongly influenced by pH and temperature. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **93**:196–204.

## 9 Seznam použitých zkratek

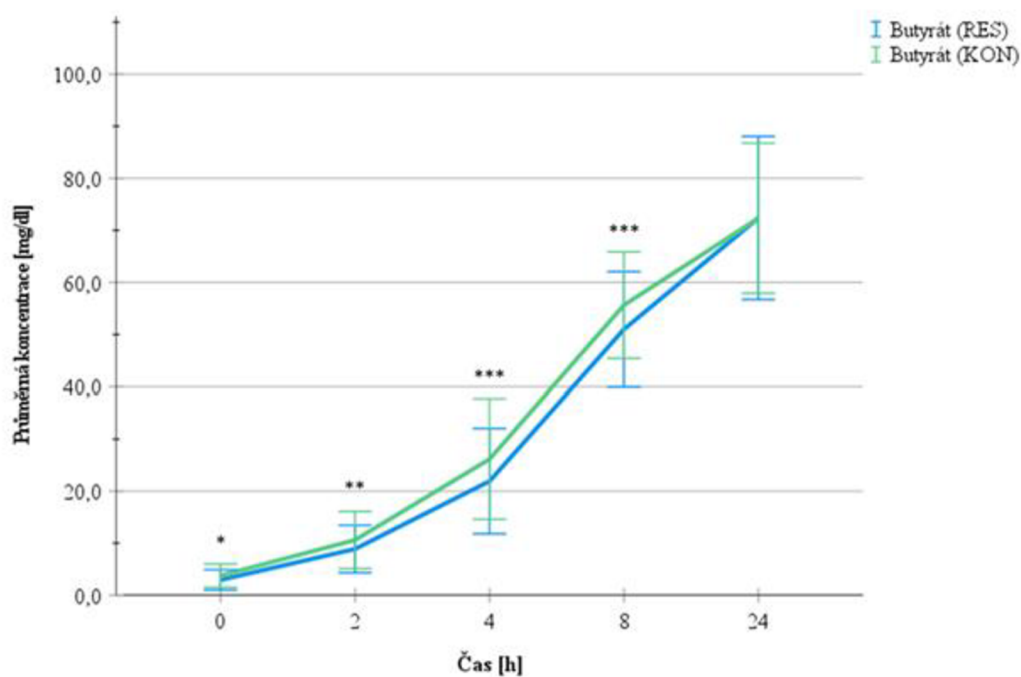
ADP:	adenosindifosfát
AMPK:	adenosin-5'-monofosfát aktivovaná protein kináza
BBFO:	broadband observation sonda
DHR:	dihydroresveratrol
DNA:	deoxyribonukleová kyselina
FID:	signál volné precese
GC-MS:	plynová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií
HCoV:	lidský koronavirus
LC-MS:	kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií
MS:	hmotnostní spektrometrie
NF:	nukleární faktor
NMR:	nukleární magnetická rezonance
PGC-1 $\alpha$ :	koaktivátor 1 $\alpha$ receptoru pro peroxisomový proliferátor
RES:	resveratrol
RNA:	ribonukleová kyselina
rRNA:	ribozomální ribonukleová kyselina
SARS-CoV:	koronavirus související s těžkým akutním respiračním syndromem
SCID:	těžká kombinovaná imunodeficience
SIRT-1:	sirtuin 1
SULT:	sulfotransferázy
UGT:	uridin-5'-difosfát-glukuronosyltransferázy
UHPLC/Q-TOF:	vysokoučinná kapalinová chromatografie spojená s kvadrupólovým a průletovým analyzátozem
UV:	ultrafialové záření

## 10 Samostatné přílohy

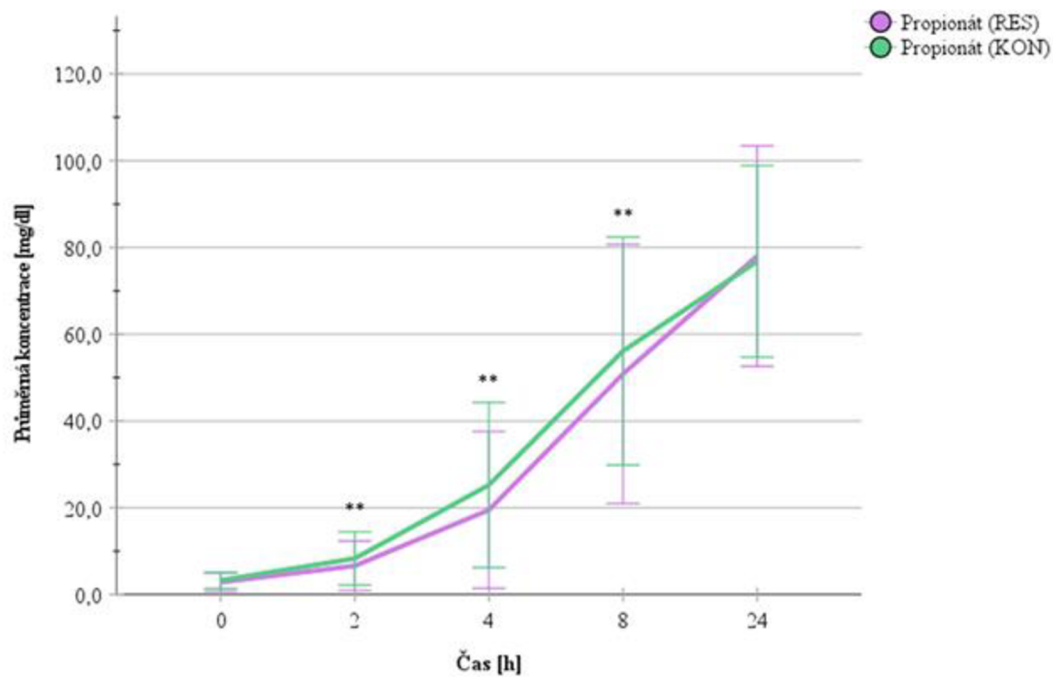
Příloha 1 Graf závislosti průměrné koncentrace ( $\pm$  směrodatná odchylka) acetátu na čase v ošetřené a kontrolní variantě; N = 20, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001



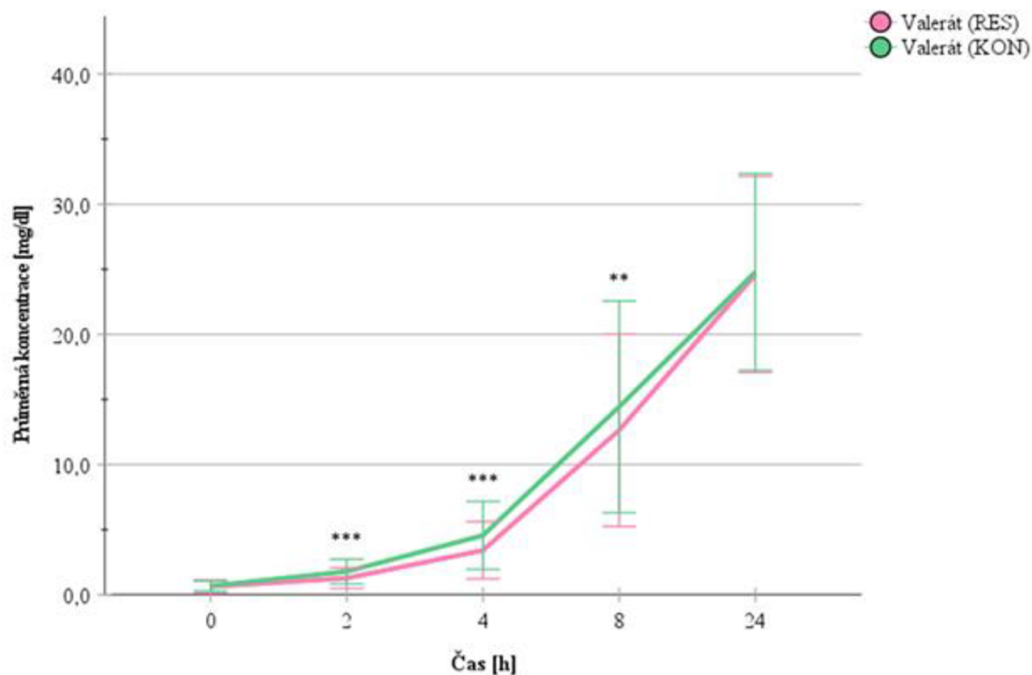
Příloha 2 Graf závislosti průměrné koncentrace ( $\pm$  směrodatná odchylka) butyrátu na čase v ošetřené (RES) a kontrolní variantě (KON); N = 20, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001



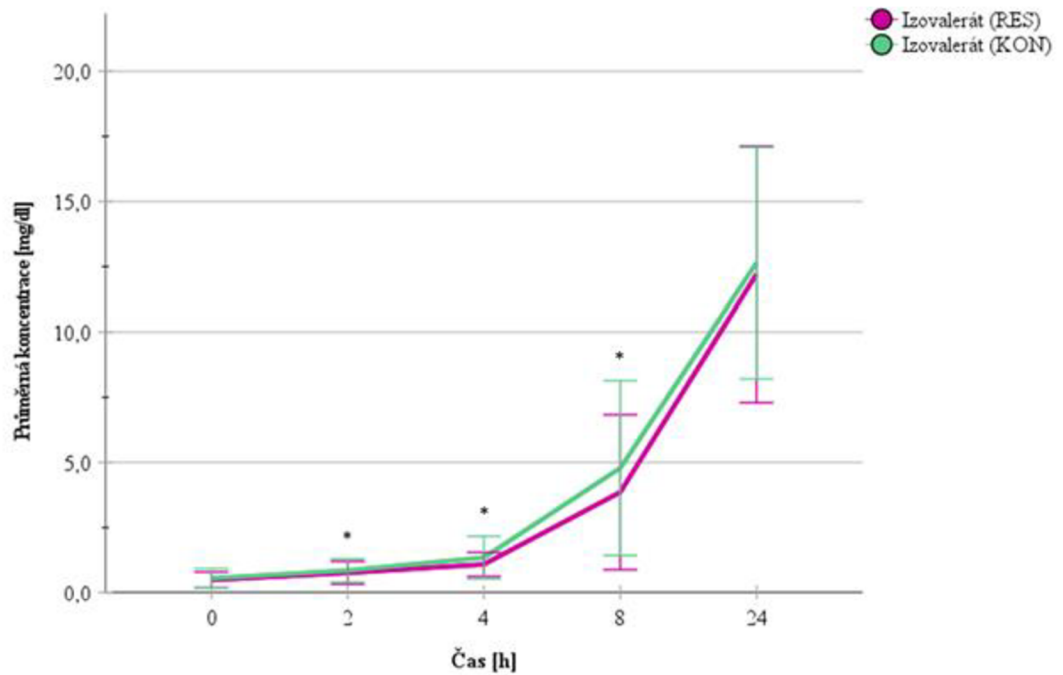
**Příloha 3 Graf závislosti průměrné koncentrace ( $\pm$  směrodatná odchylka) propionátu na čase v ošetřené (RES) a kontrolní variantě (KON); N = 20, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01**



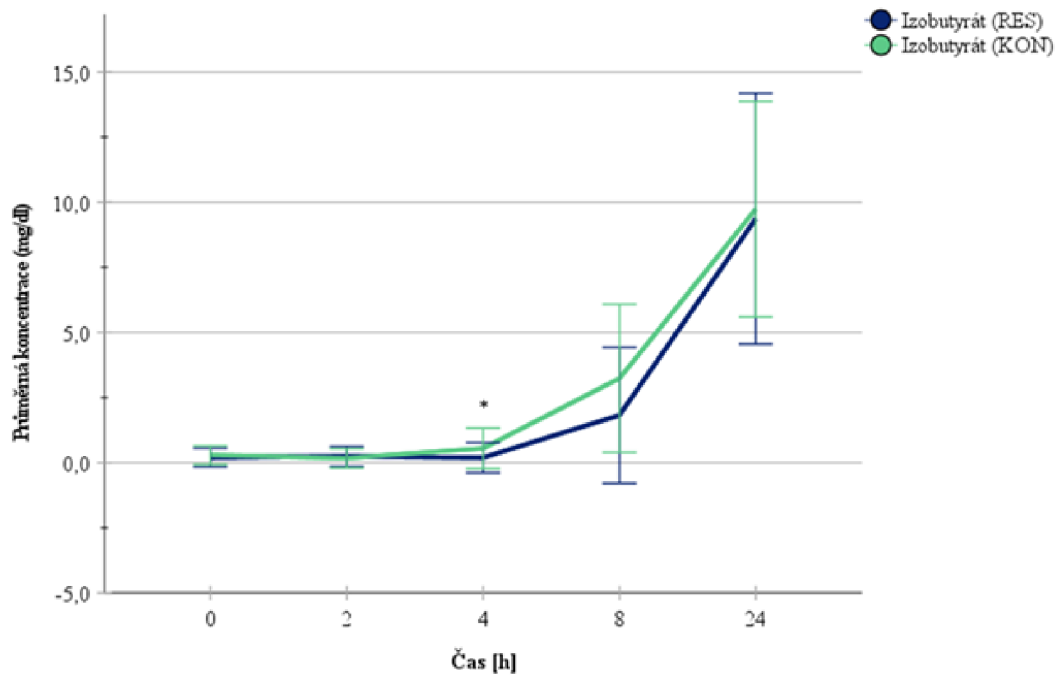
**Příloha 4 Graf závislosti průměrné koncentrace ( $\pm$  směrodatná odchylka) valerátu na čase v ošetřené (RES) a kontrolní variantě (KON); N = 20, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001**



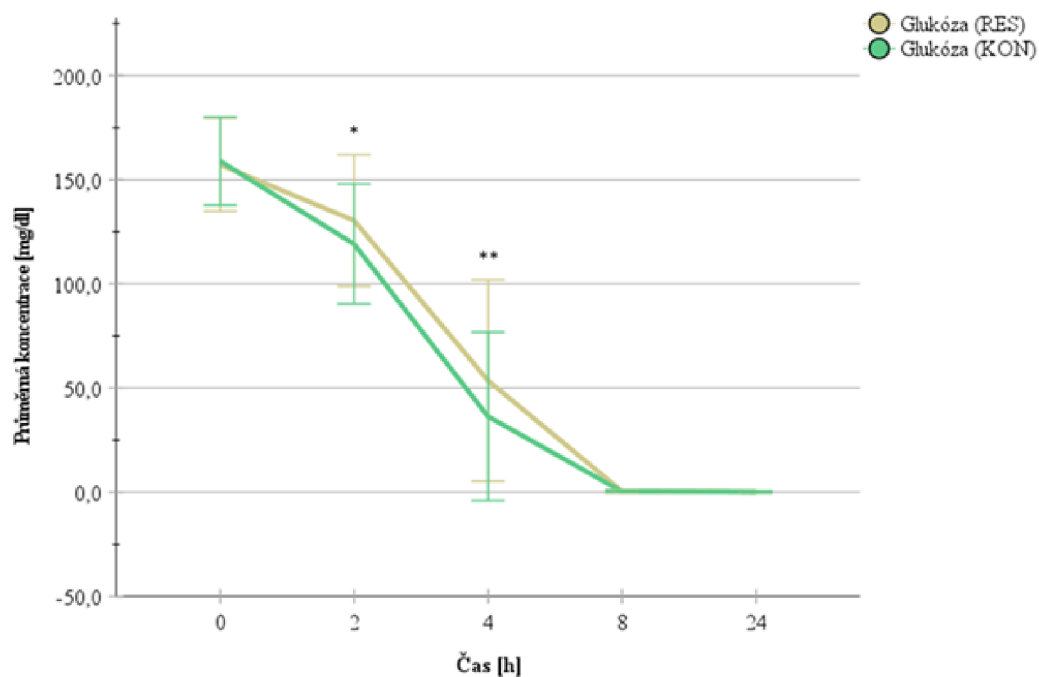
**Příloha 5 Graf závislosti průměrné koncentrace ( $\pm$  směrodatná odchylka) izovalerátu na čase v ošetřené (RES) a kontrolní variantě (KON); N = 20, \* p < 0,05**



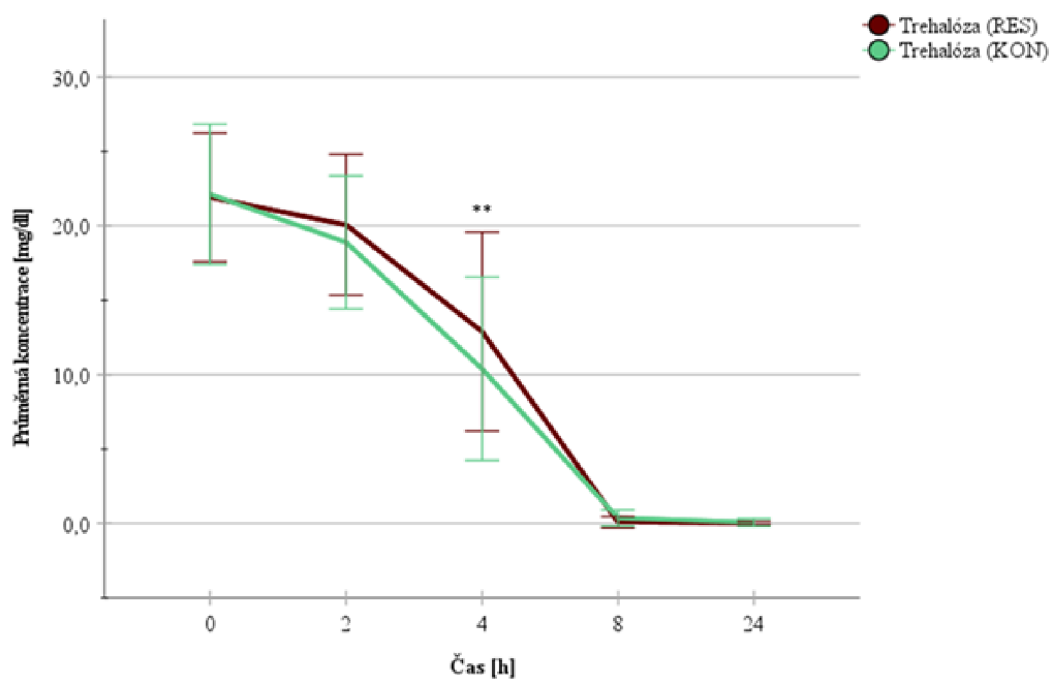
**Příloha 6 Graf závislosti průměrné koncentrace ( $\pm$  směrodatná odchylka) izobutyrátu na čase v ošetřené (RES) a kontrolní variantě (KON); N = 20, \* p < 0,05**



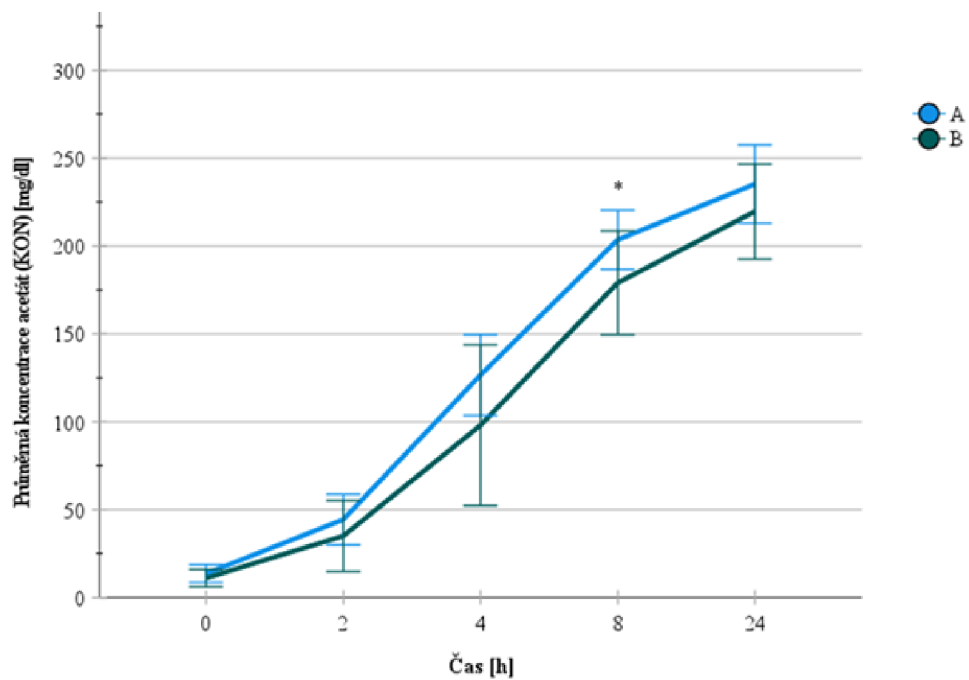
**Příloha 7 Graf závislosti průměrné koncentrace ( $\pm$  směrodatná odchylka) glukózy na čase v ošetřené (RES) a kontrolní variantě (KON); N = 20, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01**



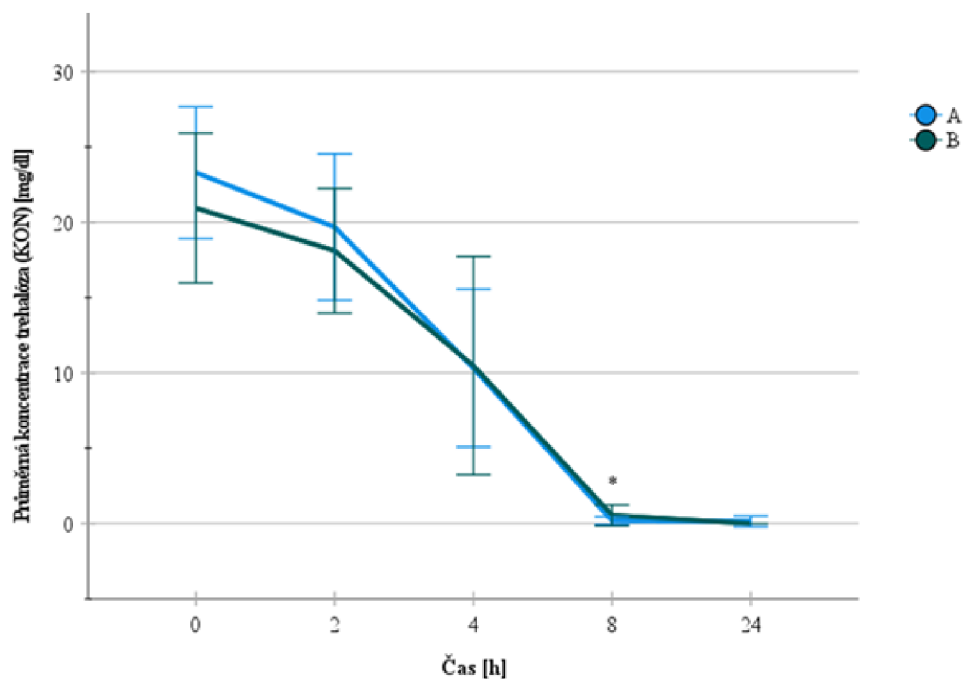
**Příloha 8 Graf závislosti průměrné koncentrace ( $\pm$  směrodatná odchylka) trehalózy na čase v ošetřené (RES) a kontrolní variantě (KON); N = 20, \*\* p < 0,01**



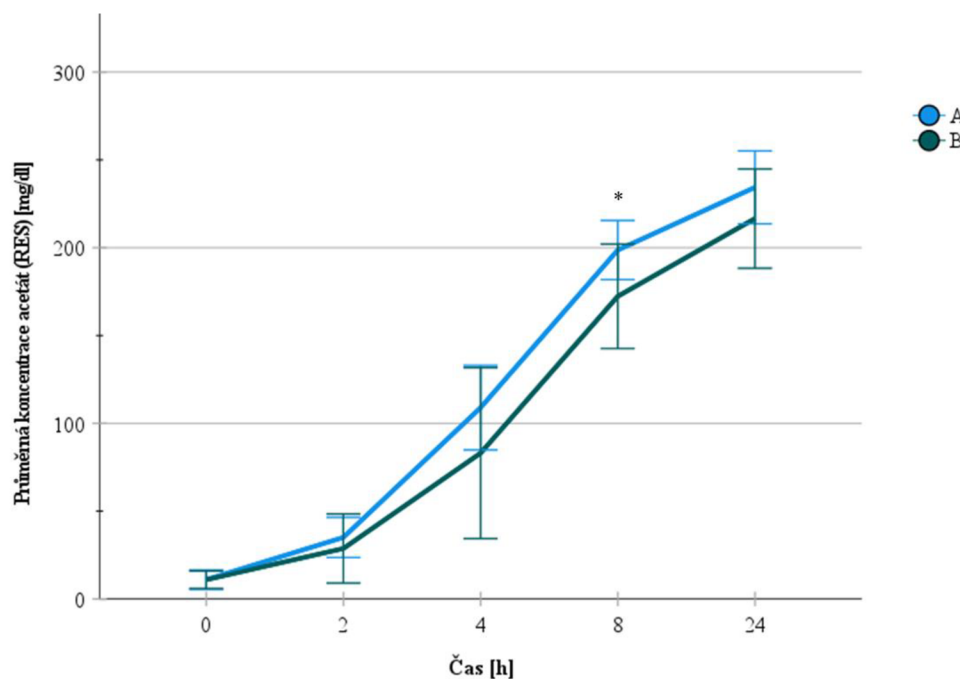
**Příloha 9 Graf závislosti průměrné koncentrace ( $\pm$  směrodatná odchylka) acetátu na čase mezi věkovými skupinami A a B v kontrolní variantě (KON); N = 20, \* p < 0,05; věková skupina A zahrnuje dárce do 45 let, věková skupina B zahrnuje dárce nad 70 let**



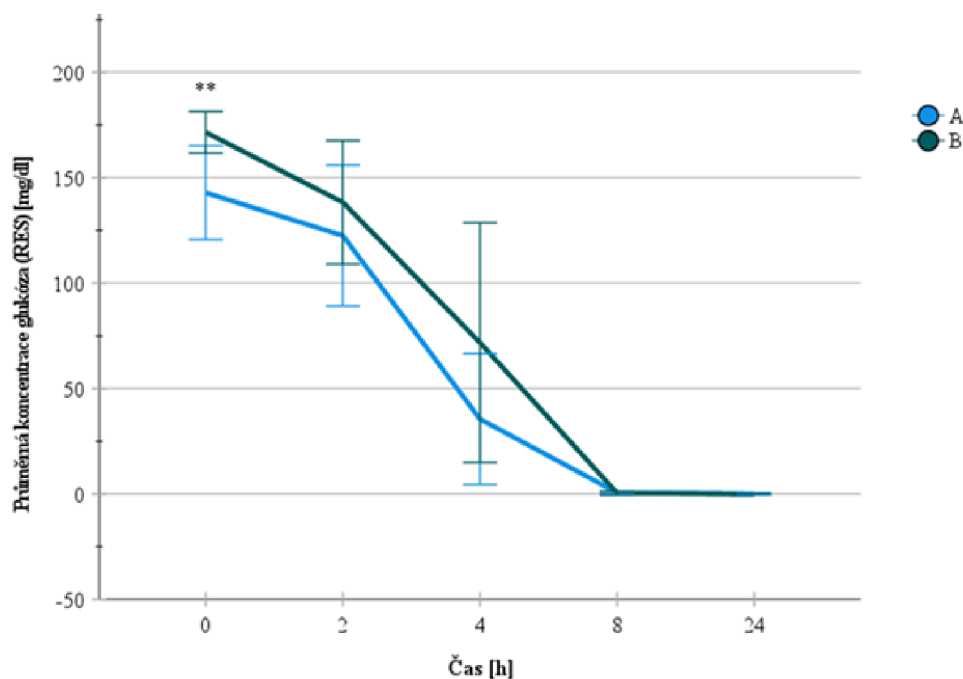
**Příloha 10 Graf závislosti průměrné koncentrace ( $\pm$  směrodatná odchylka) trehalózy na čase mezi věkovými skupinami A a B v kontrolní variantě (KON); N = 20, \* p < 0,05, věková skupina A zahrnuje dárce do 45 let, věková skupina B zahrnuje dárce nad 70 let**



**Příloha 11 Graf závislosti průměrné koncentrace ( $\pm$  směrodatná odchylka) acetátu na čase mezi věkovými skupinami A a B v ošetřené variantě (RES); N = 20, \* p < 0,05, věková skupina A zahrnuje dárce do 45 let, věková skupina B zahrnuje dárce nad 70 let**

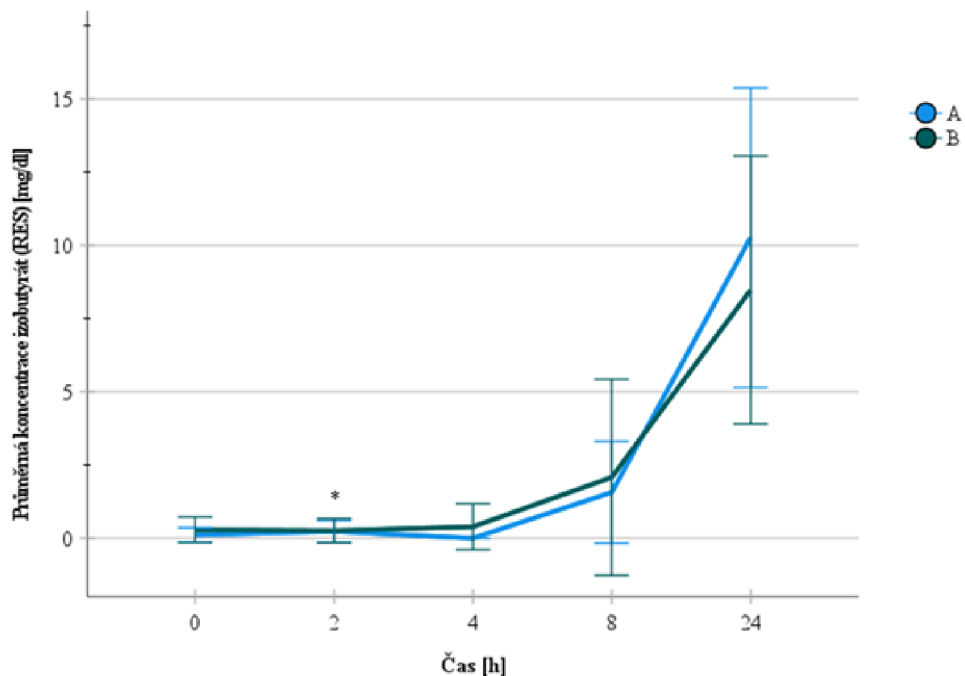


**Příloha 12 Graf závislosti průměrné koncentrace ( $\pm$  směrodatná odchylka) glukózy na čase mezi věkovými skupinami A a B v ošetřené variantě (RES); N = 20, \*\* p < 0,01, věková skupina A zahrnuje dárce do 45 let, věková skupina B zahrnuje dárce nad 70 let**





**Příloha 13 Graf závislosti průměrné koncentrace ( $\pm$  směrodatná odchylka) izobutyřátu na čase mezi věkovými skupinami A a B v ošetřené variantě (RES); N = 20, \* p < 0,05, věková skupina A zahrnuje dárce do 45 let, věková skupina B zahrnuje dárce nad 70 let**



**Příloha 14 Graf závislosti intenzity resveratrolu (RES) na čase podle jednotlivých dárců z věkové skupiny A a B; N = 20, věková skupina A zahrnuje dárce do 45 let, věková skupina B zahrnuje dárce nad 70 let**

