

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality a bezpečnosti potravin



**Metabolismus vybraných stilbenoidů
v buňkách střevní sliznice**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Kateřina Tomisová

Obor studia: Výživa a potraviny

Vedoucí práce: doc. Ing. Jaroslav Havlík, Ph.D.

© 2019 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

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

V Praze dne

Poděkování

Ráda bych touto cestou v první řadě poděkovala doc. Ing. Jaroslavu Havlíkovi, Ph.D. za jeho vlídný přístup, rady, čas a trpělivost při odborném vedení této práce. Dále patří velký dík Mgr. Petru Maršíkovi, Ph. D., Ing. Ondřeji Veselému a Ing. Veronice Jarošové za jejich ochotu, čas a veškerou podporu. Nakonec bych ráda poděkovala obrovským způsobem své rodině, která mě podporovala nejenom po dobu vypracování diplomové práce, ale i po celou dobu mého studia, měla se mnou pevné nervy a vždy věřila ve šťastné konce.

Metabolismus vybraných stilbenoidů v buňkách střevní sliznice

Souhrn

Resveratrol je molekula ze skupiny stilbenů obsažená především v červeném víně. *Trans* izomeru je připisována významná biologická aktivita. Otázkou je ovšem jeho biologická dostupnost a metabolismus jeho konfiguračního *cis* izomeru a mikrobiálních metabolitů, protože i u těchto látek je postupně objevována biologická aktivita.

V této práci byly otestovány vzorky *trans*-resveratrolu, jeho metabolitu dihydroresveratrolu a konfiguračního izomeru *cis*-resveratrolu v *in vitro* modelu střevní sliznice v závislosti na struktuře molekuly. Tyto tři molekuly byly samostatně aplikovány na standardní Caco-2 buněčnou linii kultivovanou na membránách Transwell TM systému. Následně byly odebírány vzorky z bazolaterální i apikální části inserty, a nakonec i vzorky samotných Caco-2 buněk. Vzorky byly podrobeny UHPLC/Q-TOF MS analýze, při které byly detekovány aplikované látky a jejich konjugáty. Cílem práce bylo zjistit a porovnat metabolismus fáze II tří aplikovaných molekul uvnitř střevních buněk v závislosti na struktuře jejich molekuly.

Výsledky našeho experimentu ukazují, že metabolismus konfiguračních izomerů resveratrolu vede k různým poměrům sulfátových a glukuronidových konjugátů. Hlavním konjugátem *trans*-resveratrolu byl detekován sulfát, zatímco u *cis*-resveratrolu byl hlavním konjugátem detekován glukuronid. Dihydroresveratrol obsahující ethanový můstek podstoupil během intracelulárního metabolismu nejrozsáhlejší konjugaci, která dominantně vedla ke vzniku glukuronidu. Příčinou je pravděpodobně substrátová specifita exprimovaných typů glukuronyltransferáz a sulfotransferáz na základě struktury substrátu. Volnější otáčivost ethanového můstku v molekule dihydroresveratrolu může vést k proměnlivosti struktury molekuly, která se tak stane substrátem pro větší množství glukuronyltransferáz s různou substrátovou specifitou.

Klíčová slova: stilben, resveratrol, intestinální metabolismus, caco-2 buňky, resorbce

Metabolism of selected stilbenoid in intestinal epithelial model

Summary

Resveratrol molecule belongs to a group of stilbenes contained mainly in a red wine. A significant biological activity is attributed to the resveratrols *trans* isomer. However, the bioavailability of resveratrols and metabolism of its *cis* isomer configuration and microbial metabolites are still open questions - a biological activity is discovered also in these substances.

Samples of *trans*-resveratrol, its metabolite dihydroresveratrol and *cis*-resveratrol configuration isomer were tested in an *in vitro* model of an intestinal mucosa depending on a structure of the molecule in this work. These three molecules were separately applied to a standard Caco-2 cell line cultured on Transwell TM membranes. Subsequently, samples were taken from both a basolateral and an apical parts of the inserts, and also from the Caco-2 cells. The samples were subjected to UHPLC/Q-TOF MS analysis in order to detect the applied substances and their conjugates. The aim of this work was to discover and compare the phase II metabolism of three applied molecules within the intestinal cells in dependence on their molecule structure.

The results of our experiment show that the metabolism of resveratrol configuration isomers results in different ratios of sulfate and glucuronide conjugates. Sulfate was detected as the main *trans*-resveratrol conjugate, whereas glucuronide was detected as the main conjugate for *cis*-resveratrol. The ethane bridge-containing dihydroresveratrol undergoes the most extensive conjugation during intracellular metabolism, leading to glucuronide formation. The cause is probably the substrate specificity of the expressed types of glucuronyltransferases and sulfotransferases based on substrate structure. The looser rotation of the ethane bridge in the dihydroresveratrol molecule can lead to variability in the structure of the molecule, which then becomes a substrate for a greater amount of glucuronyl transferases with different substrate specificities.

Keywords: stilbens, resveratrol, intestinal metabolism, caco-2 cells, resorption

Obsah

1	Úvod	1
2	Cíl práce	2
3	Literární rešerše	3
3.1	Stilbeny	3
3.1.1	Resveratrol.....	4
3.1.1.1	<i>Trans</i> a <i>cis</i> izomer resveratrolu.....	6
3.1.1.2	Dihydroresveratrol	6
3.1.1.3	Antioxidační a prooxidační aktivita resveratrolu	7
3.1.1.4	Resveratrol jako aktivátor genů SIRT1.....	8
3.2	Absorpční a transportní mechanismy střevní sliznice	9
3.2.1	Absorpce a transport polyfenolů do enterocytů	9
3.2.1.1	Pasivní difuze	9
3.2.1.2	Paracelulární transport.....	10
3.2.1.3	Aktivní a facilitovaný transport.....	10
3.2.1.4	Aktivní vypuzování (Efflux).....	10
3.2.1.5	Vezikulární transport	11
3.2.2	Absorpce a transport resveratrolu.....	11
3.3	Metabolismus Resveratrolu	12
3.3.1	Biologická dostupnost resveratrolu	14
3.3.2	Biologická aktivita metabolitů resveratrolu	14
3.4	Modely střevní sliznice pro studium transportních mechanismů	15
3.4.1	Caco-2 buněčná linie	16
3.4.2	Některé další buněčné linie ve studiu střevní absorpce	18
3.4.3	Permeability assay na buněčné linii Caco-2	19
4	Materiál a metoda	22
4.1	Princip metody	22
4.2	Permeability assay	22
4.2.1	Příprava sloučenin.....	22
4.2.2	Buněčné kultury	22
4.2.3	Příprava insertů s buňkami Caco-2	23
4.2.4	Měření integrity monovrstvy.....	23
4.2.5	Metabolismus a absorpce testovaných sloučenin	23
4.3	LC/MS analýza	24

4.3.1	Příprava vzorků	24
4.3.2	Podmínky měření	24
4.4	Analýza dat	25
5	Výsledky	26
5.1	<i>Trans-resveratrol</i>	27
5.1.1	Bazolaterální strana inserty	28
5.1.2	Apikální strana inserty a intracelulární obsah hledaných látek.....	28
5.2	Dihydroresveratrol	30
5.2.1	Bazolaterální strana inserty	31
5.2.2	Apikální strana inserty a intracelulární obsah hledaných látek.....	31
5.3	<i>Cis-resveratrol</i>	33
5.3.1	Bazolaterální strana inserty	34
5.3.2	Apikální strana inserty a intracelulární obsah hledaných látek.....	34
6	Diskuze	35
6.1	<i>Trans-resveratrol</i>	35
6.2	Dihydroresveratrol	37
6.3	<i>Cis-resveratrol</i>	39
7	Závěr	40
8	Literatura	41
9	Seznam tabulek a obrázků.....	48
9.1	Seznam tabulek	48
9.2	Seznam obrázků.....	48
10	Seznam použitých zkratk a symbolů	49

1 Úvod

Stilbeny jsou látky patřící do rodiny polyfenolů. Jsou součástí běžné stravy. Nacházejí se v některých potravinách rostlinného původu, jako jsou arašídý, kakao, nebo vinné hrozny. V rostlinách jsou produkovány jako reakce na riziko plísňových onemocnění. Ukazuje se, že kromě podpory odolnosti vůči rostlinným infekcím, mají svůj význam i pro ochranu lidského zdraví jako antioxidanty a také pro své protinádorové působení.

V současné době a zejména v rámci posledních desetiletí ve vyspělých zemích roste počet nádorových a kardiovaskulárních onemocnění, které jsou dávány do souvislosti s civilizačními chorobami. Tato onemocnění jsou nejčastější příčinou úmrtí obyvatel nad 65 let v Evropě i v USA. Příčinou je změna celkového životního stylu populace v rozvinutých zemích, která se týká například snížené fyzické aktivity. Zásadní je i změna stravovacích návyků a složení jídelníčku. Ten kromě jiného často postrádá potřebné množství vlákniny a obsahuje více tuků s obsahem nasycených mastných kyselin.

Velmi překvapivé tak bylo v devadesátých letech zjištění, že Francouzi, navzdory svému jídelníčku s poměrně vyšším obsahem nasycených mastných kyselin, mají relativně nízký výskyt akutních srdečních příhod. Tento jev je označován jako Francouzský paradox a je vysvětlován pravidelnou a vyváženou konzumací červeného vína. Právě toto zjištění vedlo ke zvýšenému zájmu o molekulu resveratrolu. Resveratrol patří do rodiny stilbenů a je obsažen hlavně v červeném víně. Množstvím studií byly prokázány jeho protinádorové, kardioprotektivní, ale i další pozitivní účinky na lidské zdraví.

Pro reálné využití resveratrolu pro léčivé nebo preventivní účely je však zásadní znalost jeho metabolismu a biologické dostupnosti *in vivo*. Resveratrol se ve víně vyskytuje ve dvou konformačních formách *cis* a *trans*. *Trans*-resveratrol je stabilnější a převážná většina studií se doposud zaměřovala právě na tuto formu. Bohužel výsledky zatím vedou ke zjištění jeho nízké biologické dostupnosti v důsledku celkově rozsáhlé konjugace enzymy metabolismu fáze II ve tkáních různých orgánů. Znalosti o jeho metabolismu v konkrétních tkáních *in vivo* jsou zatím ještě omezené. Biologickou dostupnost resveratrolu ovlivňuje také interakce se střevní mikrobiotou, jejímž důsledkem je vznik dalších metabolitů, především dihydroresveratrolu. Nové studie ukazují možnost biologické aktivity nejen *trans*-resveratrolu, ale i jeho *cis* formy a jeho metabolitů. Tato práce se zabývá studiem metabolismu a transportu různých forem a metabolitů resveratrolu uvnitř modelu buněk střevní sliznice.

2 Cíl práce

Zatímco transport a metabolismus *trans*-resveratrolu v modelu střevní sliznice je poměrně dobře znám, nejsou tyto parametry známy u jeho metabolitů a *cis* izomeru resveratrolu. Tato znalost je významná pro pochopení míry biologické aktivity těchto konkrétních látek, ale i pro obecné studium bioaktivity skupiny stilbenoidů. Důležitou roli ve způsobu transportu i metabolismu mají strukturní změny molekuly resveratrolu. Cílem této práce je proto otestovat vybrané vzorky *trans*-resveratrolu, jeho metabolitu dihydroresveratrolu a konfiguračního izomeru *cis*-resveratrolu. Zjistit a porovnat metabolismus fáze II a transport těchto molekul v *in vitro* modelu střevní sliznice v závislosti na struktuře molekuly. Jako model střevní sliznice je použita standardní Caco-2 buněčná linie kultivovaná na membránách Transwell TM systému.

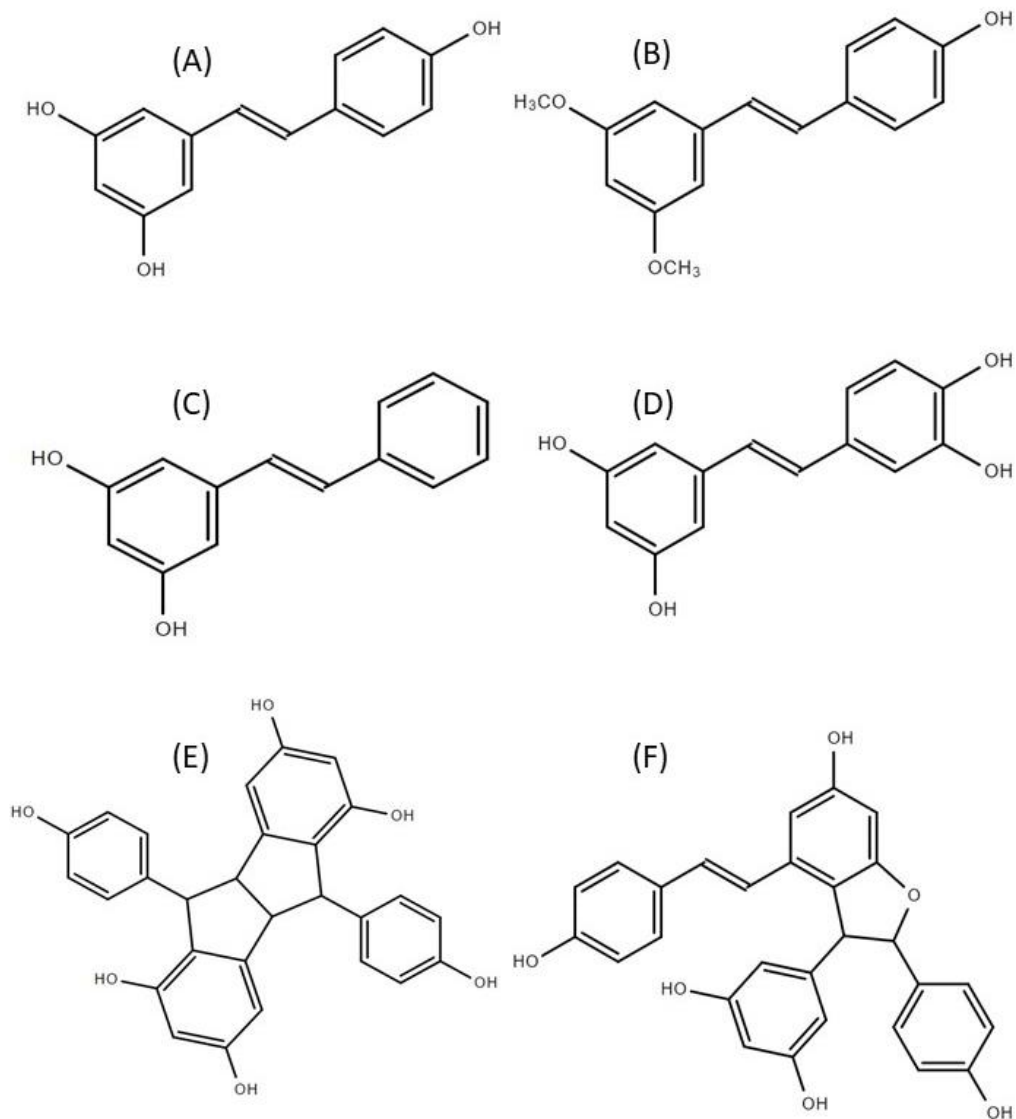
Hypotéza: Předpokládáme, že strukturní změny molekuly resveratrolu vedou v modelu střevního epitelu ke změně poměrů jeho konjugátů.

3 Literární rešerše

3.1 Stilbeny

Stilbeny, nebo též stilbenoidy, jsou fenolové přírodní látky syntetizované celou řadou rostlin jako jejich sekundární metabolity vznikající především jako reakce na mikrobiální napadení nebo jiný stres. Biogeneze stilbenů navazuje na šikamátovou a polyketidovou dráhu a je velmi podobná biogenezi flavonoidů. Molekula stilbenoidů vychází z klíčové molekuly stilbenu se strukturou C6-C2-C6 (*trans*-1,2-difenylethylen). Jednotlivé stilbeny se od sebe liší následnou polohou a povahou substituentů na molekule stilbenu. Stilbenoidy existují jak samostatně, tak v podobě oligomerů, nebo jako konjugované v podobě glykosidů (Yu & Jez 2008).

S pokročilými analytickými metodami jsou dnes známy stovky stilbenoidů a jen mezi lety 2009 a 2013 jich bylo objeveno 60 nových (Niesen et al. 2013). Stilbenoidy jsou hojně zkoumány pro své různé biologické aktivity od vlivu na kardiovaskulární onemocnění (Lacerda et al. 2018), neuroprotektivní účinky (Jin et al. 2008) přes protizánětlivé působení (Lee et al. 2009) až po cytotoxické účinky na tumorové buňky (Mishima et al. 2003). Provedené studie představují nesčetné množství modelů od buněčných kultur až po studie na zvířatech, nebo v podobě klinických studií. Mezi nejznámější a nejrozšířenější stilbeny patří resveratrol, ϵ -viniferin, pallidol, pinosylvin, piceatanol a pterostilben zobrazené na Obrázku 1. K jednomu z nejvíce studovaných stilbenoidů patří fytoalexin resveratrol (Neveau et al. 2010).



Obrázek 1: Nejznámější stilbeny

(A) *trans*-resveratrol, (B) pterostilben, (C) pinosylvin, (D) piceatanol, (E) pallidol, (F) ε-viniferin

3.1.1 Resveratrol

Resveratrol je látka, o které se poprvé zmínil M. Takaoko v roce 1939 poté, co ji izoloval z Kýchavice velkokvěté (*Veratrum grandiflorum*). Avšak největší zájem o její studium přinesla hypotéza tzv. Francouzského paradoxu v devadesátých letech, která odstartovala rozsáhlé studie o jeho biologických vlastnostech. Od té doby byla prokázána jeho biologická aktivita vzhledem k jeho polyfenolové struktuře především jako antioxidantu (Catalgol et al. 2012).

Resveratrol je triviální název pro 3,4,5-trihydroxystilben, který existuje dle orientace ethenového můstku, ve dvou konformačních izomerech *cis* nebo *trans*. V rostlinách se přirozeně vyskytují i jeho další formy jako je glukosid, a to například ve formě piceidu (β -glukosyloxy skupina je vázána v poloze 3), nebo jako resveratrolsid (β -glukosyloxy skupina je vázána v poloze 4). Kromě toho z resveratrolu vznikají také jeho dehydrooligomery jako je α -viniferin, nebo ϵ -viniferin, ale i mnoho dalších (Šmidrkal et al. 2001).

Resveratrol je téměř nerozpustný ve vodě ($\log P = 2,57$ a rozpustnost ve vodě 0,069 g/l), je to velmi slabě kyselá látka a je nositelem hořké chuti (University of Alberta 2017).

Výskyt resveratrolu jako fytoalexinu byl potvrzen již u více než 70 rostlin (Catalgol et al. 2012). Zejména u vinné révy je známá souvislost mezi infekcí plísní *Botrytis cinerea* a syntézou resveratrolu v listech a slupkách hroznů. Množství resveratrolu ve slupce se liší dle kultivaru a dle geografického původu vinné révy. Červené víno je zkvašováno i se slupkami, a proto obsahuje vyšší koncentraci resveratrolu než bílé víno, a to v rozmezí 0,2-5,8 mg/l, v přímé korelaci s velikostí fermentace. Resveratrol je typicky přítomen v bobulových rostlinách jako jsou borůvky, červený rybíz, jahody či brusinky. V těchto plodech je však obsah resveratrolu v rozmezí 3-30 $\mu\text{g/g}$ čerstvé váhy, což odpovídá pouze méně než 10 % obsahu ve vinných hroznech. Kromě bobulových rostlin se nachází v menším množství i v arašidech, luštěninách, ale i v dalších rostlinných produktech (Niesen et al. 2013).

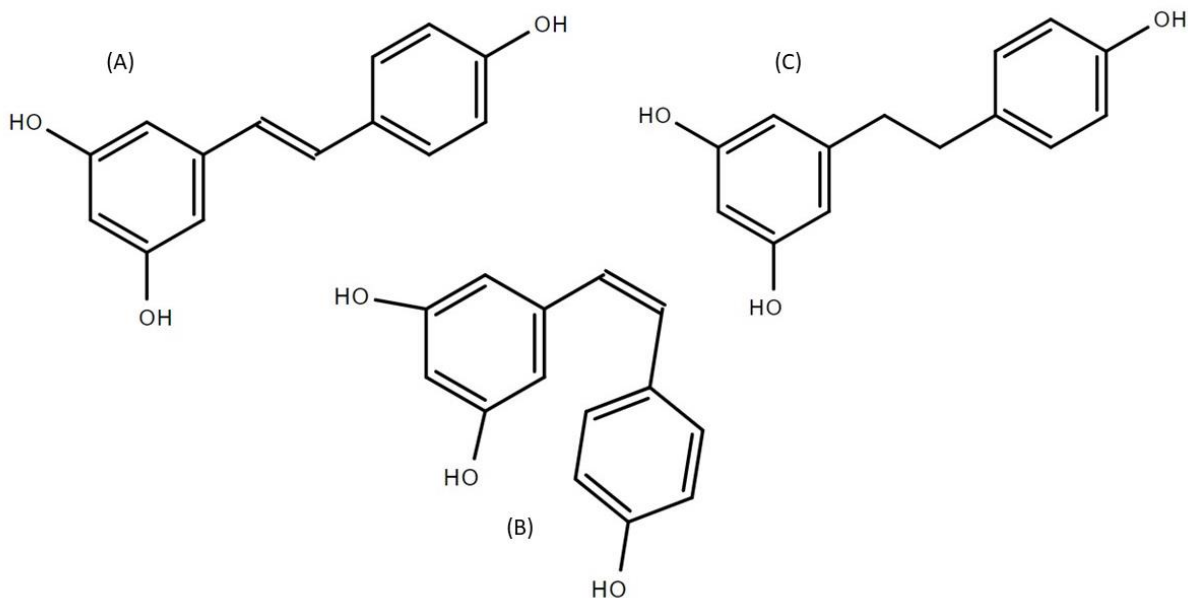
I když sám resveratrol byl izolován teprve na začátku dvacátého století, jeho příznivé účinky jsou tradičně využívány asijskou lidovou medicínou. Jako jeho zdroj je v tradiční medicíně používána rostlina *Poligonum cuspidatum*, jejíž sušené kořeny slouží k léčbě zánětů nebo hyperlipidémie (Planas et al. 2012). V posledních desetiletích bylo popsáno mnoho příznivých účinků resveratrolu na lidské zdraví. Důkazy přesvědčivě naznačují jeho velký potenciál v boji s kardiovaskulárními chorobami (Wu & Hsieh 2011), neurodegenerativními procesy (Richard et al. 2011), rakovinou (Shukla & Singh 2011), ale i dalšími nemocemi. I díky tomu, že zatím nebyly objeveny důkazy o jeho výrazné toxicitě, je resveratrol považován za slibné nutraceutikum, tedy látku na pomezí potravin a léčiv s preventivní schopností předcházet nemocem. *In vivo* studie však ukazují, že využití resveratrolu v medicíně nebo farmacii nebude tak jednoduché. *In vivo* totiž resveratrol nedosahuje dostatečně vysokých plasmatických koncentrací. Příčina jeho nízké biologické dostupnosti a nalezení prostředků k jejímu zvýšení je nyní předmětem mnoha studií (Planas et al. 2012).

3.1.1.1 *Trans* a *cis* izomer resveratrolu

V rostlinách i ve víně se resveratrol přirozeně vyskytuje jako *cis*- a *trans*-isomer. *Trans* izomer je hlavní a stabilnější přírodní forma. Díky své stabilitě je *trans*-resveratrol nejčastěji používanou a také studovanou izoformou resveratrolu. Většina studií o farmakologických účincích doposud zvažovala právě *trans*-resveratrol, pravděpodobně právě kvůli nižší stabilitě *cis*-resveratrolu a jeho nedostupnosti na komerčním trhu. Nicméně *cis*-izomer se může vytvářet z *trans* formy především působením slunečního záření (Chen et al. 2007), ale i vystavením umělému nebo přirozenému UV záření při vlnových délkách 254 nm (Leiro et al. 2004) nebo 366 nm (Basly et al. 2000). *Trans* izomer je detekován nejenom ve vínech, ale i v některých čerstvých rostlinných potravinách jako například ve vinných hroznech, nebo arašídech (Burns et al. 2002). Na rozdíl od něj je *cis*-resveratrol v čerstvých rostlinných potravinách většinou detekován ve velmi malé koncentraci (Moreno et al. 2008). Bývá nalezen hlavně ve víně společně s *trans*-resveratolem. Obsah *cis*- a *trans*-resveratrolu ve víně je rozmanitý dle odrůdy vína. V některých vínech je obsah *cis*-resveratrolu dokonce vyšší než obsah *trans*-resveratrolu (Romero-Pérez et al. 2002). *Cis*-resveratrol proto lze uvažovat jako neméně významný zdroj resveratrolu v lidské výživě jako je *trans*-resveratrol.

3.1.1.2 Dihydroresveratrol

Dihydroresveratrol je látka vyskytující se jako fytoalexin v některých rostlinách, například v orchidejích (Fritzmeier & Kindl 1983). Produkce je pravděpodobně vyvolána plísnovou infekcí rostlin (Adesanya et al. 1989). V posledních letech je však pozornost této molekule věnována především jako hlavnímu metabolitu při požití *trans*-resveratrolu u živočichů, který vzniká alifatickou hydrogenací ethenového můstku *trans*-resveratrolu střevní mikrobiotou (Bub et al. 2013). Dihydroresveratrol tedy vzniká ještě před transportem přes buňky střevní sliznice. Uvnitř buněk střevní sliznice pak dochází k jeho metabolickým přeměnám. Toto tvrzení potvrzuje také studie na myších, u nichž byl po perorálním podání *trans*-resveratrolu detekován v moči nejenom dihydroresveratrol, ale také konjugovaný dihydroresveratrol-sulfát (Wang et al. 2005).



Obrázek 2: Konfigurační izomery resveratrolu a dihydroresveratrol
 (A) *trans*-resveratrol, (B) *cis*-resveratrol, (C) dihydroresveratrol

3.1.1.3 Antioxidační a prooxidační aktivita resveratrolu

Antioxidační aktivita resveratrolu je dána přítomností konjugovaného systému dvojných vazeb. Takto uspořádaný systém delokalizovaných π -elektronů je schopen přijmout navíc jeden nepárový elektron volného radikálu. Resveratrol jako akceptor elektronu zabraňuje dalšímu šíření a působení radikálu. Je proto označován jako tzv. zhášec nebo *scavenger*. Díky této schopnosti vykazuje ochranný účinek proti lipidové peroxidaci v buněčných membránách a poškození DNA způsobené především reaktivními formami kyslíku (ROS), jako je hydroxylový a superoxidový radikál (Leonard et al. 2003).

Jak ale ukazují další studie, v přítomnosti přechodných kovů může mít resveratrol naopak prooxidační aktivitu vedoucí ke vzniku volných radikálů. Většina studií je zaměřena na reakci s měďnatým kationtem. Měď je v organismu součástí řady enzymů. Předpokládá se, že resveratrol se v přítomnosti Cu^{2+} oxiduje a dává vzniknout Cu^{1+} . Měďný kationt nadále může reagovat s kyslíkem za vzniku kyslíkového radikálu. V přítomnosti vodíkových iontů reaguje kyslíkový radikál za vzniku peroxidu vodíku, z kterého mohou vznikat hydroxylové radikály poškozující molekulu DNA (Zheng et al. 2006; Tamboli et al. 2012).

Existují ale i hypotézy, že i prooxidativní vlastnosti resveratrolu mohou mít v organismu pozitivní účinky, a to v boji s nádorovými buňkami. Hypotéza předpokládá, že vznikající ROS mohou zprostředkovat poškození nádorových buněk vedoucí k jejich apoptóze. Protože nádorové buňky obsahují vyšší hladinu mědi než buňky zdravé (Ebara et al. 2000), jsou vystaveny větší expozici volných radikálů (Hadi et al. 2000; Zheng et al. 2006).

3.1.1.4 Resveratrol jako aktivátor genů SIRT1

Resveratrol je v současné době považován za aktivátor tzv. *silent information regulator genes* (SIRT). U savců je rodina těchto genů složena ze sedmi genů SIRT1 až SIRT7. Tyto geny kódují specifické deacetylační NAD⁺ dependentní enzymy známé jako sirtuiny. Zvýšená exprese těchto enzymů vede ke zprostředkované antiproliferační a protizánětlivé aktivitě a ke změně některých metabolických drah (S. Mohar 2012).

Studium mechanismů účinku sirtuinů na fyziologické procesy organismu stále probíhá. Zatím se ukazuje, že resveratrol je v lidském organismu zřejmě schopen aktivovat pouze jeden gen z celé rodiny, a to gen SIRT1 (Borra et al. 2005). Tento gen má však vliv na mnoho různých procesů. Bylo prokázáno, že exprese SIRT1 pomáhá deacetylaci syntázy oxidu dusnatého, čímž aktivuje a zvyšuje produkci oxidu dusnatého v endotelu (Mattagajasingh et al. 2007). Oxid dusnatý je vazodilatační látka působící na buňky hladké svaloviny cév a snižuje hodnoty krevního tlaku.

Další studie ukazují vliv resveratrolem aktivovaných sirtuinů na snížení hypertenze pomocí angiotenzinu II. Angiotenzin II je hormon, který se váže na AT1 receptory buněk hladké svaloviny. Aktivované AT1 receptory jsou zodpovědné za vazokonstrikci, která vede ke zvýšení krevního tlaku. Podání resveratrolu potlačuje prostřednictvím aktivace SIRT1 expresi AT1 receptorů jak *in-vitro*, tak *in-vivo*, a tím utlumuje angiotenzin II indukovanou hypertenzi (Miyazaki et al. 2008).

3.2 Absorpční a transportní mechanismy střevní sliznice

Látky obsažené v potravě přijaté perorálně jsou tráveny a následně vstřebávány na sliznici gastrointestinálního traktu v závislosti na enzymatické výbavě a chemickém prostředí pasáží gastrointestinálního traktu (GIT). K hlavnímu vstřebávání živin dochází na sliznici tenkého střeva. Luminální membrána enterocytů je vybavena k transportu látek z lumen dovnitř enterocytu. Transport látek probíhá v závislosti na typu resorbované látky různými způsoby (Švíglerová & Slavíková 2013).

Absorpce a transport látek přes enterocyt do krve nebo lymfy je zásadním předpokladem pro její využití organismem, a kromě dalších vlivů jako jsou enzymy v lumen střeva, nebo zpracování játry, má zásadní vliv na její biologickou dostupnost. *In vivo* plazmatické koncentrace podskupiny polyfenolů flavonoidů jsou například běžně mnohonásobně nižší než jejich IC50 (*half maximal inhibitory concentration*) nebo EC50 (*Half maximal effective concentration*). Nízká biologická dostupnost brání farmakologickým účinkům polyfenolů a vývoji těchto látek jako léčebných agens. Kromě efektu tzv. *first pass metabolism* může mít na nízkou biologickou dostupnost vliv také vztah mezi strukturálními vlastnostmi polyfenolů a jejich absorpčními mechanismy střevní sliznice a jejich následnými metabolickými cestami. Proto jsou poznatky o molekulárních vlastnostech polyfenolů a jejich absorpčních a transportních mechanismech velmi důležité, ale zatím nejsou tyto oblasti bohužel dostatečně probádané (Rastogi & Jana 2016).

3.2.1 Absorpce a transport polyfenolů do enterocytů

3.2.1.1 Pasivní difuze

Pasivní difuzí jsou přepravovány malé hydrofobní nebo neutrální částice polyfenolů ($\log P > 2,0$). Jejich zpracování ve střevním lumenu s sebou nese stejné procesy jako v případě jiných hydrofobních dietních složek, jako jsou například tuky nebo vitaminy rozpustné v tucích. Dochází k emulzifikaci žlučovými kyselinami a zabudování polyfenolů do micel. Ty jsou střevními pohyby dopravovány z lumen střeva k povrchu kartáčového lemu, kde se z micel uvolňují a difundují do enterocytu (Domínguez-Avila et al. 2017).

Značně složité polyfenoly, například kondenzované nebo oligomerní, nejsou pro svoji velikost připraveny k transportu do enterocytu. Protože lidské tenké střevo není přizpůsobeno

k jejich hydrolyzaci, přecházejí tyto polyfenoly beze změn do tlustého střeva, kde jsou fermentovány střevní mikrobiotou. Jsou zde hydrolyzovány a vzniklé monomery již mohou přecházet pasivní difuzí do buněk tlustého střeva (Domínguez-Avila et al. 2017).

3.2.1.2 Paracelulární transport

Enterocyty jsou apikálně spojeny mezibuněčnými spoji typu *tight junction* prostřednictvím bílkovin kladinu. Spojení tvoří bariéru proti průniku látek okolo enterocytů. Kladin způsobuje v oblastech *tight junction* specifický elektrický odpor. Nicméně hydrofobní ($\log P > 2,0$) a neutrální polyfenoly, ale i jiné nanočástice s nábojem (jako např. kyselina chlorogenová) mohou v drobných mezerách mezi spoji procházet. I když je paracelulární transport vybraných polyfenolů možný, jejich permeace touto cestou je nízká (Domínguez-Avila et al. 2017).

3.2.1.3 Aktivní a facilitovaný transport

Aktivní a facilitovaný transport je nejčastěji studován vzhledem k jejich využití pro transport léků. Oba transporty jsou zprostředkovány membránovými přenašeči, ale zatímco k aktivnímu transportu je třeba dodat energii, facilitovaný transport probíhá po koncentračním gradientu a nepotřebuje dodávku energie. Většina polyfenolů je ještě před transportem modifikována bakteriálními enzymy. Z tohoto pohledu lze aktivní a facilitovaný transport rozdělit do tří skupin na glykosylované polyfenoly, kationtové aglykony a neutrální nebo hydrofobní aglykony.

Vzhledem ke své cukerné části se mohou glykosylované polyfenoly transportovat pomocí SGLT1 (*sodium/glucose co-transporter 1*) nebo GLUT 2 a 5 (*glucose transporters*) (Domínguez-Avila et al. 2017).

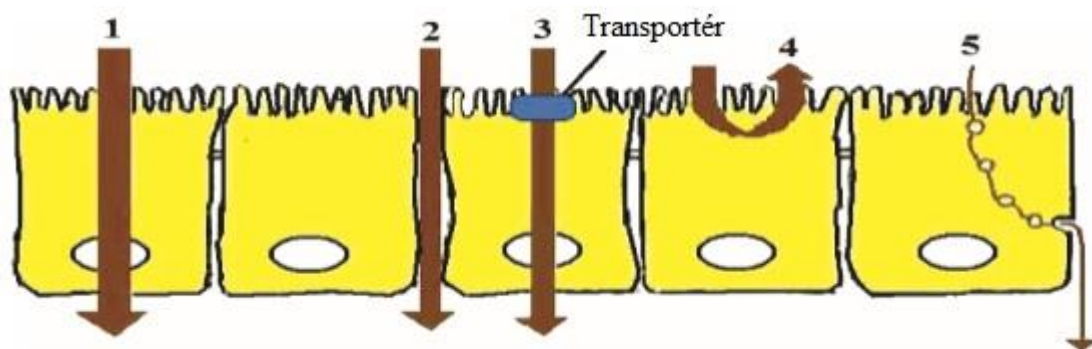
3.2.1.4 Aktivní vypuzování (Efflux)

Effluxní transportéry fungují jako ochrana před vstřebáním látek neprospěšných tělu do krevního řečiště. Poté, co je látka vstřebána z lumen střeva do enterocytu, může být ještě vyloučena zpět do lumen. Tyto transportéry mají velmi širokou specifitu pro různé strukturně nepříbuzné substráty a jsou předmětem zkoumání především jako příčina lékových rezistencí.

Předmětem zkoumání v souvislosti s aktivním vypuzováním polyfenolů, zejména resveratrolu jsou často tzv. ABC střevní transportéry (Planas et al. 2012).

3.2.1.5 Vezikulární transport

Látky, které nejsou schopné se výše zmíněnými způsoby dostat dovnitř enterocytu, mají ještě možnost vezikulárního transportu. Tohoto transportu využívají makromolekulární látky. Nízká transportní kapacita a přítomnost proteolytických enzymů v membránových vezikulách omezují tuto cestu jako obecnou cestou pro dopravu léků a dalších bioaktivních látek (Shah et al. 2006).



Obrázek 3: Schéma možností transportu látek dovnitř buněk

(1) Pasivní transcelulární transport, (2) Paracelulární transport, (3) Aktivní transport, (4) Aktivní vypuzování, (5) Vezikulární transport (Shah et al. 2006)

3.2.2 Absorpce a transport resveratrolu

Resveratrol vykazuje nízkou rozpustnost ve vodě (< 0,05 mg/ml). Lépe se rozpouští v alkoholech nebo lipidech. Díky své dostatečné afinitě k lipidové dvojvrstvě luminální membrány enterocytů je vstřebáván především pasivní difuzí, která je velmi rychlá a účinná. K pasivní difuzi je resveratrol vhodný také menší velikostí své molekuly. Pokusy na Caco-2 buňkách ukázaly, že například jeho hydrofilnější derivát 3-O-beta-D-glukosid (označovaný jako piceid) také přítomný ve víně, i přes svoji poměrně malou molekulu je vstřebáván aktivním transportem zprostředkovaným SGLT1 transportérem. Afinita k liposomální membráně hraje důležitou roli v účinnosti buněčného vychytávání pasivní difuze lipofilních polyfenolů (Henry et al. 2005).

I když je resveratrol poměrně snadno transportován dovnitř enterocyty, jeho obsah na bazolaterální straně s tím zcela nekoresponduje. Mohou za to zřejmě tzv. ABC střevní transportéry, které mají v buňce effluxní funkci. Na apikální membráně mají enterocyty 3 effluxní ABZ transportéry, jmenovitě P-glykoprotein (P-gp), protein pro multilékovou rezistenci 2 (MRP2) a protein rezistence proti rakovině prsu (BCRP). Další transportér pro multilékovou rezistenci protein 3 (MRP3) se nachází na bazolaterální straně membrány. Pokusy za použití různých specifických inhibitorů těchto transportérů i knockoutových myší ukazují, že glukuronidové a sulfátované deriváty resveratrolu vznikající uvnitř enterocyty jsou vypuzovány zpět do lumen především transportéry MRP2, ale i MRP3 a BCRP. Tento jev snižuje efektivitu vstřebávání konjugátů resveratrolu do krevního řečiště (Planas et al. 2012). Bylo také dokázáno, že u nekonjugovaného resveratrolu dochází k effluxu, a to především pomocí MRP2 transportéru na apikální stranu buněk (Henry et al. 2005).

3.3 Metabolismus Resveratrolu

Uvnitř enterocyty dochází ke glukuronidaci a k sulfátové konjugaci resveratrolu za účelem jeho lepší rozpustnosti. Glukuronosylaci provádí převážně enzymy z nadrodiny UDP-glukuronyltransferáz (UGT), které přenáší glukuronidový zbytek na molekulu resveratrolu za vzniku O-glukuronidů etherového typu (Ledvina et al. 2011). Nadrodina savčích genů pro UGT má v současné době 117 členů, které lze rozdělit do čtyř rodin: UGT1, UGT2, UGT3 a UGT8 (Mackenzie et al. 2005). Různé typy UGT mají různou substrátovou specifitu, především dle funkčních skupin substrátu (Ledvina et al. 2011). Zároveň je exprese konkrétních typů UGT specifická pro konkrétní tkáň. Ve sliznici trávicího traktu byly identifikovány dva stereoizomery resveratrol-glukuronidu, a to resveratrol-3-O-glukuronid a resveratrol-4-O-glukuronid. V trávicím traktu se na této konjugaci zřejmě podílí UGT1A1, 1A6, 1A8, 1A9 a 1A10, jejichž substrátem je jak *cis*, tak *trans*-resveratrol (Sabolovic et al. 2006). Další typy UGT konjugačních enzymů se nachází například v játrech, kde dochází k další rozsáhlé konjugaci (Brill et al. 2006). Vzhledem k tomu, že molekula resveratrolu disponuje hned třemi hydroxylovými skupinami, které jsou všechny potenciálně dostupné pro glukuronidaci, nelze vyloučit tvorbu diglukuronidů. Tento metabolit již byl experimentálně skutečně detekován po inkubaci *trans*- a *cis*-resveratrolu s lidskými jaterními mikrozomy (Aumont et al. 2001).

Studie metabolismu *cis*-resveratrolu po orálním požití jsou méně časté než pro *trans*-resveratrol. Nicméně se zatím ukazuje, že u lidí po požití *cis*-resveratrolu perorálně lze v moči detekovat tři metabolity: *cis*-resveratrol-3-O-glukuronid, *cis*-resveratrol-3-O-sulfát a *cis*-resveratrol-4-O-sulfát (Rotches-Ribalta et al. 2012). Dále se podle výsledků detekce konjugátů *cis* a *trans*-resveratrolu v lidské moči ukazuje, že konjugace s kyselinovou glukuronovou probíhá účinněji u *cis*-resveratrolu než u *trans*-resveratrolu (Rotches-Ribalta et al. 2012). Tento trend potvrzuje i experiment na Caco-2 buňkách. Ovšem výsledky pokusů na mikrozomech buněk trávicího traktu jsou rozmanité dle dárců a poměrně nejednoznačné (Sabolovic et al. 2006). Přednostní substrátovou specifitu pro *cis* izomer resveratrolu má jaterní UGT1A6, která konjuguje zbytek kyseliny glukuronové především za vzniku *cis*-resveratrol-3-O-glukuronidu. Naopak jaterní UGT1A1 přednostně konjuguje *trans* izomer resveratrolu. Enzym UGT1A9, 1A10 a 1A7 se podílí na konjugaci obou izomerů bez větší specifity. (Aumont et al. 2001).

Enzymy provádějící sulfataci patří do nadrodiny sulfotransferáz (SULT). Lidský genom obsahuje čtyři rodiny genů sulfotransferáz: SULT1, SULT2, SULT4 a SULT6 (Stanley 2017). Bylo prokázáno, že lidská sulfotransferáza typu SULT1A1, 1A2, 1A3 a 1E1 sulfatuje resveratrol, přičemž tvoří až tři metabolity: resveratrol-3-O-sulfát, resveratrol-4-O-sulfát a resveratrol-3,4 O-disulfát (Miksits et al. 2005). Nicméně tyto tři metabolity se tvoří především v játrech. Sulfátový konjugát, který byl s jistotou detekován na Caco-2 buňkách (a tedy se předpokládá, že je tvořen v buňkách střevní sliznice) je pouze resveratrol-3-O-sulfát (Li et al. 2003).

Nekonjugovaný a konjugovaný resveratrol, který unikl effluxním pumpám, dosáhne krve a portálním řečištěm je dopraven do jater (Planas et al. 2012). Jakmile resveratrol dorazí do jater, podstoupí nový proces metabolismu fáze II. Odtud většina resveratrolu a jeho metabolitů putují do krevního řečiště (Wang et al. 2004).

V krevním řečišti se aglykon resveratrolu i jeho metabolity mohou vázat na krevní bílkoviny nebo lipoproteiny (Wang et al. 2004). Burkon a Somoza (2008) uvádějí, že 50 % sulfatovaného a glukuronidovaného resveratrolu je spojeno s plazmatickými bílkovinami (Burkon & Somoza 2008). Do tělních buněk již resveratrol a jeho metabolity vstupují samostatně, musí se tedy vyvázat z vazby na proteiny i lipoproteiny. Zbývající resveratrol a jeho deriváty v krvi jsou distribuovány v různých tkáních, anebo jsou vyloučeny ledvinami (Planas et al. 2012).

3.3.1 Biologická dostupnost resveratrolu

Biologická dostupnost je pojem, který může být vyjádřen jako: „*podíl léčiva obsaženého v podaném léčivém přípravku, který se dostává ve farmakologicky aktivní formě do systémové cirkulace*“ (Dostálek et al. 2006). I když resveratrol vykazuje vysokou bioaktivitu, podíl, který se nezměněn dostane do systémové cirkulace, je velmi malý. Absorpce resveratrolu do enterocytů sice probíhá účinným pasivním transportem, kterým se do enterocytů vstřebá přibližně 75 % dávky. Do periferní krve se však dostane pouze asi 1,5 % nemodifikovaného resveratrolu. Zbytek je pravděpodobně uvnitř enterocytu, nebo v jiných tkáních metabolizován (Planas et al. 2012). Ze studie *in vivo* na myších, kterou provedli Juan et al (2010) vyplývá, že navíc z objemu modifikovaného resveratrolu uvnitř enterocytu je ještě 54 % vráceno zpět do střevního lumen (Juan et al. 2010). Metabolismus uvnitř enterocytů a effluxní transportéry se zdají být hlavními příčinami nízké biologické dostupnosti resveratrolu při perorálním podání.

Nicméně některé studie ukazují, že i přes nízkou biologickou dostupnost dosahuje resveratrol v organismu některých účinků, například chemopreventivních (Brown et al. 2010). Vysvětlením může být, že hladina metabolitů v plazmě může fungovat jako zásobník, z něhož může být resveratrol mobilizován dekonjugací enzymy, jako jsou například sulfatázy nebo glukuronidázy, které modifikovaný resveratrol zpracují ve tkáních zpět na samotný resveratrol (Franciosa et al. 2014). Pro tuto hypotézu ale zatím neexistují důkazy.

3.3.2 Biologická aktivita metabolitů resveratrolu

Otázkou také je biologická aktivita samotných metabolitů resveratrolu. V současné době jsou dostupné pouze poměrně omezené informace týkající se možných přínosných biologických aktivit metabolitů resveratrolu. Aktivní se v některých ohledech zdají být sulfátované konjugáty, zatím se ale zdá, že jejich aktivita se snižuje s rostoucím stupněm sulfatace (Maier-Salamon et al. 2013). Údaje o biologické aktivitě resveratrolových glukuronidů jsou stále vzácné. Jedním z mála zjištění je možný antiobézní účinek resveratrol-3-O-glukuronidu a resveratrol-4-O-glukuronidu, které indukují delipidační účinky v dozrávajících preadipocytech a ve zralých adipocytech srovnatelně s jejich mateřskou molekulou resveratrolu (Lasa et al. 2012). Je tedy možné, že metabolity resveratrolu mohou

přispívat k různým biologickým aktivitám, které zatím byly připisovány pouze resveratrolu. Na toto téma je ještě třeba provést nové vědecké studie.

3.4 Modely střevní sliznice pro studium transportních mechanismů

Studium farmakokinetiky léčiv nebo jiných potenciálně biologicky aktivních látek zahrnuje studium mnoha dějů ovlivňujících osud látky v organismu. Mezi základní farmakokinetické děje se řadí absorpce, distribuce, metabolismus a exkrece látky organismem. Při absorpci látka proniká do krevního nebo lymfatického řečiště. Množství absorbované látky, její přeměna během absorpce a rychlost absorpce významně ovlivňuje rychlost nástupu účinku, intenzitu účinku i vlastní účinek dané látky v organismu (Dostálek et al. 2006). Při perorálním podání látky je typická zpožděná a pomalejší absorpce, dále možná částečná absorpce ve více úsecích trávicího traktu, vliv průchodu látky oddíly trávicího traktu s rozdílnými hodnotami pH a také možný vliv okolní tráveniny nebo mikroflóry střeva. Studium absorpce látky po perorálním podání je komplexní proces, na jehož konci by měla být informace o množství, způsobu absorpce a podobě absorbované látky v krvi. Pro studium absorpce se používají biologické modely. *In vitro* modely využívají různé buněčné linie. Dále se používají *in situ* modely střevní perfuze a *in vivo* zvířecí modely (Barthe et al. 1999).

Pro studium absorpce metodou *in vivo* se využívají zvířecí modely, především potkanů. Výhodou *in vivo* zvířecích modelů je možnost pozorování celkové absorpce včetně vlivu biotransformačních a presystémových faktorů. Nevýhodou je časová náročnost, velký počet zvířat, etická otázka a celkový počet proměnných. Diskutovaná je pak korelace s výsledky u lidí (Barthe et al. 1999).

Pokusy *in situ* se nejčastěji používají na malých laboratorních zvířatech. Výzkumy absorpce ve střevní sliznici probíhají na anestetizovaných zvířatech, které jsou kanylovány a perfundovány roztokem zkoumaného vzorku. Vlastnosti vstupujícího perfuzátu s obsahem vzorku lze kontrolovat z hlediska koncentrace, pH, osmolality, průtoku i z hlediska výběru střevního segmentu. Tento způsob testování je jedním z nejbližších k *in vivo* systému, především proto, že funkce laboratorního zvířete jako je zásobené krve, inervace a clearance zůstávají nedotčené. Technika *in situ* perfuze neposkytuje informace o procesech na úrovni buněk. Absorpce zkoumané látky také může být ovlivněna anestezí a chirurgickou manipulací (Barthe et al. 1999).

In vitro metody využívají pro výzkum střevní absorpce buněčné linie nebo buněčné tkáně. Buněčné linie jsou buňky charakteristické neomezeným počtem buněčného dělení. Jsou to buňky s narušenou regulací buněčného cyklu a mohou to být tedy například nádorové buňky izolované z postiženého organismu. Hlavním cílem *in vitro* metod je zjistit, jaký typ transportu a popřípadě transportéru se podílí na přestupu látky přes buňku střevního epitelu a jakým metabolismem uvnitř buňky látka prochází. Tyto *in vitro* metody pomáhají objasnit konkrétní transport přes střevní epitel. Oproti *in vivo* metodám nejsou výsledky ovlivněny interakcí s jinými orgány. Výhodou také je, že lze provádět experimenty s látkami, které mají negativní vliv na tyto buňky. Z etického hlediska nevadí, když při pokusu dojde ke zničení buněčné linie. Nevýhodou ovšem je, že podmínky *in vitro* nikdy zcela neodpovídají podmínkám *in vivo*. A zároveň buněčné linie *in vitro* jsou vždy v jisté míře odlišné od *in vivo* tkání, jako je přítomnost různých buněčných typů, proměna fenotypu a podobně. *In vitro* buněčné linie se často používají pro screening absorpce léčiva v časném stadiu procesu vývoje léčiva, ale i pro výzkum absorpce a transportu ostatních látek v trávicím traktu (Artursson et al. 2001).

3.4.1 Caco-2 buněčná linie

Buněčná linie Caco-2 pochází ze sedmdesátých let dvacátého století. Jsou to buňky lidského adenokarcinomu tlustého střeva, které vyvinul Jorgen Fogh se svými kolegy v Sloan-Kettering institutu pro výzkum rakoviny. Přes to, že jsou Caco-2 buněčné linie prapůvodem buňky tlustého střeva, při kultivaci odpovídají více epitelu tenkého střeva (Glahn 2009). Karyotyp této buněčné linie je hypertetraploidní, ovšem se značnou variabilitou v počtu chromozomů mezi jednotlivými buňkami. Klíčovými strukturálními vlastnostmi Caco-2 buněčných linií je růst do cylindrického tvaru, přítomnost kartáčového lemu a tvorba polarizovaných buněk s mezibuněčnými spoji, především typu *tight junction* (Quaroni & Hochman 1996).

Funkční vlastností je adheze a produkce většiny trávicích enzymů kartáčového lemu. Význam pro studie absorpce látek má například přítomnost P-glykoproteinové effluxní pumpy a intestinálního di/tripeptidového transportéru. V buňkách jsou exprimovány také glukozové transportéry GLUT1 (lokalizovaný primárně v bazolaterální membráně), GLUT3 (v apikální membráně) a GLUT5 (v obou membránových doménách). Buňky Caco-2 mohou účinně transportovat žlučové kyseliny a vitamin B12. Syntetizují a sekretují také některé apolipoproteinové částice. (Quaroni & Hochman 1996). Na povrchu mají přítomné receptory

pro *Escherichia coli* tepelně stabilní enterotoxin, nízkodenzitní protein (LDL), inzulinu podobné růstové faktory (IGF-I a IGFII), vazoaktivní intestinální peptid (VIP), inzulin, katecholamin, transferin a prostaglandiny a specifické transportéry pro fruktózu a taurin. Také exprimují enzymy sacharázu, izomaltázu, laktázu, alkalickou fosfatázu, aminopeptidázu, endopeptidázu, ale i další enzymy, receptory a dokonce hormony (Meunier et al. 1995). Základní vlastnosti buněk Caco-2 jsou přehledně shrnuty v Tabulce 1.

Caco-2 buněčné linie jsou díky těmto vlastnostem dobrým modelovým systémem pro simulaci procesů ve střevní sliznici. Nicméně ve srovnání s normálním intestinálním epitelem má buněčný model Caco-2 některá omezení. Normální střevní epitel obsahuje na rozdíl od Caco-2 linie více buněčných typů. Kromě enterocytů jsou ve střevní sliznici přítomny například pohárkové nebo endokrinní buňky. Dále v Caco-2 buněčném modelu není přítomen hlen jako ochranná kluzká vrstva epitelu, která má také vliv na absorpci střevní sliznicí. V Caco-2 modelu nejsou přítomny také další nebuněčné látky přirozeně se vyskytující v lumen střevní sliznice jako žlučové kyseliny, jejichž přítomnost ovlivňuje vstřebávání především lipofilních látek (Lea 2015). Caco-2 buněčné linie na rozdíl od enterocytů mají sníženou sekreci některých rodin enzymů cytochromu P450 (Fossati et al. 2008). Tyto enzymy provádí ve střevě počáteční biotransformaci požitých xenobiotik. Pomáhají tak detoxikaci, ale mohou způsobovat také presystémovou eliminaci léčiv po perorálním podání (van Herwaarden et al. 2009). Při extrapolaci výsledků z in vitro Caco-2 buněčných modelů do in vivo stavu je třeba brát tyto vlastnosti v úvahu (Lea 2015).

Permeační vlastnosti látek na Caco-2 buněčných liniích korelují s permeačními vlastnostmi lidské střevní sliznice a mohou být použity k předpovídání orální absorpce léků i jiných látek u lidí (Balimane & Chong 2005). Díky své histologické i metabolické podobnosti s lidskými enterocyty se buněčná linie Caco-2 nejčastěji používá jako in vitro model pro výzkum:

- buněčné permeability potenciálních kandidátů na léčivo
- objasnění cesty transportu léků, nutrientů, nebo dalších látek
- posouzení formulační strategie navržené pro zvýšení propustnosti membrány
- stanovení optimální fyzikálně-chemické vlastnosti pro pasivní difuzi léčiv
- posouzení potenciálních toxických účinků léčivých kandidátů nebo složek formulace na tuto biologickou bariéru
- studium presystémového metabolismu látek (Artursson et al. 2001)

Tabulka 1: Shrnutí základních vlastností buněk Caco-2

Způsob růstu	Buňky rostou v kultuře jako adherentní monovrstva epiteliálních buněk
Diferenciace	Za standardních podmínek 14-21 dní od konfluence
Morfologie buněk	Polarizované buňky s těsnými spoji a kartáčovým lemem na apikální straně
Elektrické parametry	Vysoký elektrický odpor
Trávicí enzymy	Exprimují typické trávicí enzymy, membránové peptidázy a disacharidázy tenkého střeva (laktáza, aminopeptidáza N, sacharáza-izomaltáza a dipeptidylpeptidáza IV)
Aktivní transport	Aminokyseliny, cukry, vitaminy, hormony
Membránové iontové transportéry	Na ⁺ /K ⁺ ATPáza, H ⁺ /K ⁺ ATPáza, Na ⁺ /H ⁺ výměník, Na ⁺ /K ⁺ /Cl ⁻ transportér, apikální chloridové kanály
Membránové ne-iontové transportéry	P-glykoproteinová pumpa, protein pro multilékovou rezistenci, protein rezistence rakoviny plic
Receptory	Vitamín B12, vitamín D3, receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR), glukózové transportéry (GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT5, SGLT1)
Produkce cytokinů	Interleukiny IL-6, IL-8, IL-15, faktor nádorové nekrózy alfa (TNF α), transformující růstový faktor beta 1 (TGF- β 1), thymický stromální lymfopoetin (TSLP)

(Lea 2015)

3.4.2 Některé další buněčné linie ve studiu střevní absorpce

Navzdory rozšířenému použití a přijatelnosti modelu buněk Caco-2 pro hodnocení permeability není ani tento model zcela ideální. Proto je všeobecná snaha nalézt další ještě optimálnější buněčné linie anebo provést některé modifikace k ještě lepší předvídatelnosti buněčného modelu Caco-2 (Balimane & Chong 2005).

Jedním takovým modelem je buněčný model 2/4/A1, který pochází ze střeva potkaního plodu. Je to nesmrtelná buněčná linie, která vytváří životaschopné diferencované monovrstvy se spoji typu *tight junction*, enzymy kartáčového lemu a transportními bílkovinami. Propustnost spojů pro paracelulární transport je menší než u Caco-2 buněk, a proto v tomto

ohledu podobnější lidské střešní sliznici. Model je vhodný především pro studium sloučenin pasivně absorbovaných paracelulární cestou (Balimane & Chong 2005).

Buněčná linie *Madin-Darby canine kidney* nebo ve zkratce MDCK byla založena v padesátých letech dvacátého století a je poměrně často používanou buněčnou linií pro hodnocení permeability. MDCK buňky jsou odvozeny od psích ledvinných buněk. Při kultivaci vytváří cylindrický epitel obsahující *tight junction*, podobně jako střešní epitel, nebo Caco-2 buněčné linie. Oproti lidským střešním Caco-2 buňkám mají ale sníženou expresi některých aktivních transportérů. Proto jsou MDCK linie vhodné především k hodnocení pasivního transportu sloučeniny. Výhodou je ovšem krátká třídní doba kultivace (Balimane & Chong 2005).

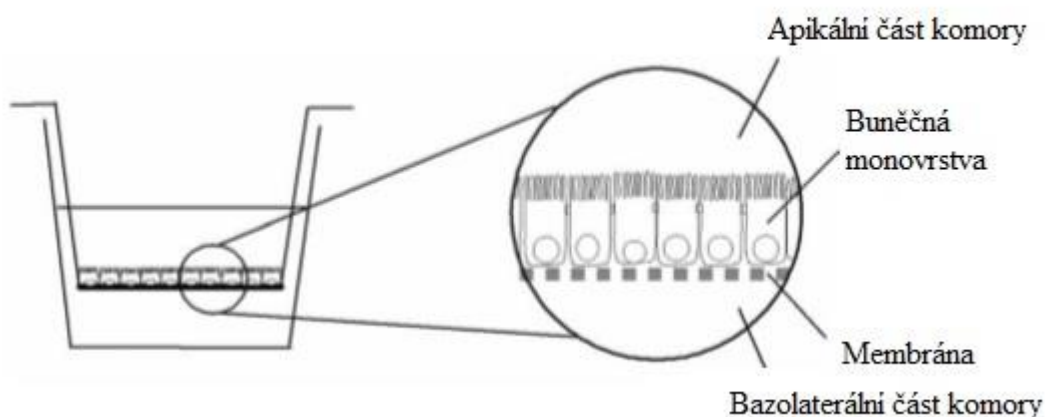
Zajímavými buňkami jsou buňky HT-29. Při kultivaci za standardních podmínek a za přítomnosti glukózy, tvoří vícevrstevné nediferencované buňky, které postrádají těsná spojení a funkční polaritu. Nicméně výhodou těchto buněk je, že za určitých kultivačních podmínek podléhají diferenciaci na polarizované monovrstvy buněk sekretujících hlen nebo buněk absorpčních. Buněčný model Caco-2 se skládá pouze z jednoho buněčného typu, a to absorpčních enterocytů a postrádá tyto jiné buněčné typy přirozeně se vyskytující v intestinálním epitelu (Ungell & Karlsson 2004).

3.4.3 Permeability assay na buněčné linii Caco-2

Střešní sliznici *in vivo* tvoří vrstva jednovrstevného cylindrického epitelu. Epitelové buňky leží na bazální membráně a jsou polarizované a propojené mezibuněčnými spoji. Díky této struktuře tvoří epitel kompaktní bariéru pro absorpci látek do krevních kapilár (Hubatsch et al. 2007). Látky se mohou absorbovat přes střešní epitel třemi základními způsoby. Jedním je transcelulární cesta, kdy absorbovaná látka prochází skrz enterocyt, a to pasivně nebo aktivně. Druhým způsobem je paracelulární transport, který probíhá pasivně přes mezibuněčné spoje se sousedícími enterocyty. A třetí cestou je transcytóza probíhající rovněž skrz enterocyt, ale pomocí tvorby vezikul (Artursson et al. 2001). Permeability assay na Caco-2 buňkách slouží jako model tohoto jednovrstevného epitelu. Ideální model by měl tyto bariéry odrážet jak kvalitativně, tak kvantitativně. Nicméně zatím žádný model nesplňuje tyto ideální vlastnosti (Quaroni & Hochman 1996).

Buňky Caco-2 lze pořídit z Evropské sbírky buněčných kultur (ECACC) nebo z Americké databáze typových kultur (ATCC). Obecně se v laboratoři kultivují při optimální teplotě 37 °C, v kultivačních nádobách a v kultivačním médiu Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, nebo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) s fetálním hovězím sérem a dalšími přísadami (Lea 2015).

Pro účel permeační studie jsou buňky vysety na transwellové vložky s propustnou membránou, na které se buňky usazují. Zapadnutím vložky do testovací komory dojde k rozdělení prostoru komory na horní apikální část a dolní bazolaterální část komory. Tyto dvě části komory jsou odděleny pouze monovrstvou buněk přichycenou na propustnou membránu transwellové vložky. Apikální komora představuje lumen střeva, zatímco bazolaterální komora představuje část krevní kapiláry nebo lymfatickou stranu gastrointestinálního traktu (van Breemen & Li 2005). V tomto uspořádání může být zkoumán transport látky ve směru z apikální části do části bazolaterální aplikací vzorku do horní komory. Po transportu vzorku přes buněčnou monovrstvu a membránu dochází ke shromažďování transportovaného vzorku ve spodní části komory. Odtud je možné vzorek odebírat a následně kvalitativně či kvantitativně analyzovat. Pro studium effluxního transportu je možné odebírat vzorek zároveň z horní části komory. Při aplikaci vzorku rovnou do spodní části komory je možné analyzovat primárně effluxní transport. (Ghaffarian & Muro 2013).



Obrázek 4: Schéma rústu Caco-2 buněk na transwellové vložce v testovací komoře

(Hubatsch et al. 2007)

Aby byl model střevní sliznice co nejideálnější, je třeba, aby kultivované buňky byly dostatečně diferencované, a zároveň, aby dosáhly konfluence, tedy určitého počtu buněk na plochu. Diferenciace je důležitá především pro to, aby při testování byly buňky biochemicky a morfologicky co nejpodobnější střevním enterocytům, tedy aby byly polarizované a exprimovaly potřebné enzymy, receptory, transportéry, hormony a další důležité faktory. Míra konfluence odpovídá epiteliální integritě.

Vyhodnocení epiteliální integrity a zralosti monovrstvy může být provedeno měřením trans-epiteliálního elektrického odporu (TEER) před a po experimentu. Měření TEER se provádí pomocí měřiče volt-ohm, jehož elektrody jsou umístěny v horní a spodní komoře (Ghaffarian & Muro 2013). Hodnoty TEER slouží jako indikátor těsnosti buněčných spojů, ovlivňují propustnost pro paracelulární transport a rostou s dobou kultivace. Nízké TEER hodnoty představují nedostatečnou integritu buněčné monovrstvy způsobenou slabými buněčnými spoji. Příliš vysoké hodnoty sice poukazují na dobré spojení buněk, ale jsou již velmi odlišné od situace *in vivo*. Typické hodnoty TEER, které indikují adekvátní celistvost monovrstvy jsou hodnoty větší než $300 \Omega \cdot \text{cm}^{-2}$ (van Breemen & Li 2005). Hodnoty TEER však nezávisí pouze na těsnosti buněčných spojů, ale také na ploše povrchu transwellových vložek, počtu naočkovaných buněk, podpěře filtru a stavu kultivace. Hodnoty TEER v lidském ileu jsou mnohonásobně nižší než na Caco-2 modelu (Shah et al. 2006).

Jinou metodou pro vyhodnocení integrity monovrstvy Caco-2 buněk je měření pasivního průchodu různých molekul přes monovrstvu. Malé hydrofilní sloučeniny procházejí monovrstvou především paracelulární cestou přes mezibuněčné spoje typu *tight junction*. S dobou kultivace se mezibuněčné spoje zahušťují a stupňují odpor pro paracelulární transport. Proto mohou být používány jako markery průchodu touto cestou. Jako marker se používá například luciferová žluť, která je snadno detekovatelná (de Angelis & Turco 2011).

Caco-2 buněčná linie vykazuje poměrně značnou buněčnou heterogenitu v diferenciaci. Některé oblasti exprimují plně diferencované buňky s mikrokly po 12-14 dnech, zatímco jiné oblasti obsahují v tu samou dobu značně méně diferencované buňky (Lea 2015). K dosažení homogenní diferenciaci monovrstvy Caco-2 buněk a zároveň dosažení vhodné konfluence dochází u Caco-2 buněčné linie typicky přibližně po 21 dnech (van Breemen & Li 2005).

4 Materiál a metoda

4.1 Princip metody

V experimentu byly zkoumány dva konfigurační izomery resveratrolu: *cis*-resveratrol a *trans*-resveratrol a jeden derivát resveratrolu: dihydroresveratrol. Každá z těchto látek byla zvlášť aplikována na apikální část komory připravené Caco-2 buněčné linie. V průběhu čtyř hodin od aplikace vzorků byly v předem daných časových intervalech odebírány vzorky z bazální části komory. Navíc byly odebrány vzorky z apikální části komory hned na začátku experimentu při aplikaci vzorku a také na konci po uplynutí čtyř hodin. Následně byly po uplynutí čtyř hodin od aplikace látek odebrány jako vzorek i samotné Caco-2 buňky pro analýzu intracelulárního obsahu derivátů resveratrolu. Experiment proběhl v několika biologických opakováních pro každou ze tří aplikovaných látek.

V odebraných vzorcích byly pomocí UHPLC/Q-TOF MS analýzy hledány a měřeny vybrané metabolity resveratrolu.

4.2 Permeability assay

4.2.1 Příprava sloučenin

Trans-resveratrol o čistotě 98 % byl získán od společnosti Merck (Německo), *cis*-resveratrol a dihydroresveratrol od společnosti ChemFaces (Čína) také o čistotě 98 %. Všechny vzorky byly zředěny do výsledné koncentrace 20 μ M dimetylsulfoxidem (DMSO) a následně HBSS (Hanks' Balanced Salt solution).

4.2.2 Buněčné kultury

Lidská epiteliální střevní buněčná linie Caco-2 byla získána z American Type Tissue Collection (Rockville, Maryland, USA). Buňky byly kultivovány v DMEM (Dulbecco's modified Eagles medium) s přidavkem 10 % fetálního bovinního séra (FBS), 1 % neesenciálních aminokyselin, 1 % penicilinu a streptomycinu. Všechny tyto sloučeniny byly pořízeny od společnosti Sigma-Aldrich (Praha, ČR). Kultivační lahve byly uchovávány v CO₂ inkubátoru (37 °C a 5% CO₂ atmosféra). Médium bylo měněno každé dva až tři dny a buňky byly

pasážovány každý týden. Životaschopnost směsi Caco-2 po ošetření stilbenoidy byla hodnocena s použitím MTT testu cytotoxicity, původně popsaného ve studii Mosmann (1983).

4.2.3 Příprava insertů s buňkami Caco-2

Pro provedení samotné permeability assay byla použita 25. pasáž Caco-2 buněčné linie. Buňky byly nejprve pročištěny od média a poté rozpuštěny v DMEM v koncentraci $0,6 \times 10^6$ buněk na 1 ml. Inserty ve 24-jamkových destičkách byly přibližně 2 minuty před naočkováním předvlhčeny 50 μ l média a následně byla přidána buněčná suspenze o koncentraci $2,6 \times 10^5$ buněk na cm^2 . Bazolaterální komora byla naplněna 1 ml DMEM a inkubována při 37 °C v termostatu s 5% CO_2 . Pro odstranění neadherovaných buněk bylo po 6 hodinách inkubace odstraněno médium z apikální strany a nahrazeno 0,5 ml DMEM. Médium bylo denně měněno. Postup výměny média probíhal následovně: médium bylo odsáto nejdříve z bazolaterální strany a následně z apikální strany. Čerstvé DMEM bylo přidáno nejprve na apikální stranu a pak na stranu bazolaterální. Buňky byly kultivovány po dobu 21 až 25 dnů, aby se vytvořila plně uzavřená monovrstva. Poslední výměna média proběhla 16 hodin před pokusem.

4.2.4 Měření integrity monovrstvy

Inserty s monovrstvou buněčné linie Caco-2 byly třikrát promyty roztokem HBBS (temperovaným na 37 °C, pH 7,4). Pro ověření dostatečné integrity buněčné bariéry byl měřen transepitheliální elektrický odpor. Všechny inserty s hodnotou nižší než 600 Ω byly vyřazeny. Následně byla přidána luciferová žluť o koncentraci 25 μ M a destičky byly inkubovány 1 hodinu v CO_2 inkubátoru (37 °C, 5% CO_2 , 150 r.p.m.). Destičky byly měřeny v readeru Tecan Infinite M200 (vlnová délka excitace / emise 480 nm / 530 nm). Použity byly všechny inserty s buněčnou integritou vyšší než 95 %.

4.2.5 Metabolismus a absorpce testovaných sloučenin

Inserty byly třikrát promyty a do apikální části bylo přidáno 0,5 ml roztoků stilbenoidů o koncentraci 20 μ M v HBSS. Z apikální strany bylo ihned po přidání roztoku odebráno 50 μ l vzorku (v čase $T = 0$). Destičky byly inkubovány na orbitální třepačce (150 r.p.m.) v CO_2 inkubátoru (37 °C, 5 % CO_2).

Vzorky z bazolaterální části byly odebírány v časech 0,5; 1; 1,5; 2; 3 a 4 h. Odebraných 50 µl vzorku bylo nahrazeno čerstvými 50 µl HBSS. Nakonec po odebrání posledního vzorku v čase T = 4 h byl odebrán zbytek vzorku z apikální strany a inserty byly třikrát promyty HBSS. Po odebrání všech vzorků byla znovu měřena hodnota TEER pro potvrzení integrity buněčné vrstvy (> 500 Ω). Pro hodnocení absorpce testovaných sloučenin buňkami byly buňky rozpuštěny v 100% methanolu. Vzorky byly skladovány při -80 °C až do analýzy.

4.3 LC/MS analýza

4.3.1 Příprava vzorků

Vzorky permeability byly přečištěny centrifugací (centrifuga Rotanda 460R, DE) po dobu 5 minut, 15 000 RPM. Vzorky byly naočkovány vnitřním standardem (izotopově značený *trans*-resveratrol ¹³C). Vzorky zahrnovaly časový sběr na bazolaterální straně a výplach methanolem, dále také apikální stranu v čase 0 a v hodině 4. Dále byly připraveny roztoky standardů testovaných látek a byla provedena kontrola kvality směsi standardů 50 ng/mL v průběhu analýzy.

4.3.2 Podmínky měření

Analýza byla provedena na chromatografickém přístroji UHPLC Ultimate 3000 (Thermo Fischer Scientific, USA) s přidruženým hmotnostním spektrometrem Q-TOF Impact II (Bruker Daltonik, DE). Chromatografie byla zprvu provedena za pomoci kolony Kinetex 1,7 mm F5 100 Å 100×2,1 mm (Phenomenex, USA). Jako mobilní fáze byla použita směs UHPLC vody (mobilní fáze A) s 0,1 % kyseliny mravenčí a metanol UHPLC kvality (mobilní fáze B). V čase 0 byl průtok fází A a B v poměru 8:2. Ve třetí minutě byl poměr fází 1:1. Mezi šestou a patnáctou minutou protékala pouze fáze B. Mezi patnáctou a šestnáctou minutou byl poměr upraven na 8:2. V tomto stavu byl poměr udržován do konce analýzy. Pro každý vzorek byla doba analýzy 20 minut. Teplota kolony se udržovala stabilně při 35 °C. Chlazení autosampleru probíhalo při 10 °C. Nástřikové množství 5 µl vzorku a rychlost průtoku byla udržována na 0,2 ml/min. Analýza v hmotnostním spektrometru probíhala v negativním módu za následujících podmínek: endplate offset -500 V, capillary voltage 3 kV, tlak zmlžujícího plynu 30 kPa, průtok sušícího plynu 4 l/min, teplota zdroje 250 °C. Analýzu doprovázela kalibrace na formiát sodný.

Měření byla prováděna v režimu Full Scan. Snímání spekter probíhalo v rozsahu 500–1500 m/z frekvencí 1 Hz.

Přehled aplikovaných a detekovaných stilbenoidů pomocí LC/MS analýzy znázorňuje Tabulka 2.

Tabulka 2: Seznam stilbenoidů pozorovaných a detekovaných ve vzorcích pomocí LC/MS

Jméno	Sumární vzorec	Přesná hmota neutrální molekuly	Meřená [M -H]- přesná hmota	Srovnání se standardem
monitorováno:				
<i>trans</i> -resveratrol	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	228.0786	227.0708	ANO
<i>cis</i> -resveratrol	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	228.0786	227.0708	ANO
dihydroresveratrol	C ₁₄ H ₁₄ O ₃	230.0943	229.0865	ANO
detekováno:				
<i>trans</i> -resveratrol-sulfát	C ₁₄ H ₁₂ O ₆ S	308.3064	307.0276	ANO
<i>cis</i> -resveratrol-sulfát	C ₁₄ H ₁₂ O ₆ S	308.3064	307.0276	NE
<i>trans</i> -resveratrol-O-glukuronid	C ₂₀ H ₂₀ O ₉	404.3674	403.1029	NE
<i>cis</i> -resveratrol-O-glukuronid	C ₂₀ H ₂₀ O ₉	404.3674	403.1029	NE
dihydroresveratrol-sulfát	C ₁₄ H ₁₄ O ₆ S	310.3223	309.0433	NE
dihydroresveratrol-O-glukuronid	C ₂₀ H ₂₂ O ₉	406.3832	405.1186	NE

4.4 Analýza dat

Integrace piku proběhla v programu TASQ, data byla dále zpracována v programu Microsoft Excel. Data jsou vyjádřena v grafech formou průměru biologických opakováních v jednotlivých časech. Míra statistické variability dat je vyjádřena směrodatnou odchylkou.

5 Výsledky

Na apikální stranu Caco-2 buněčné linie byly samostatně aplikovány vzorky *cis*-resveratrolu, *trans*-resveratrolu a dihydroresveratrolu. Z bazolaterální části inserty byly v časech 0 hod, 0,5 hod; 1 hod; 1,5 hod; 2 hod; 3 hod a 4 hod od aplikace odebírány vzorky pro následující LC/MS analýzu. Při MS analýze byly ve vzorcích *cis*-resveratrolu a *trans*-resveratrolu hledány a měřeny *cis*-resveratrol (*Cis-Res*), *trans*-resveratrol (*Trans-Res*), resveratrol-glukuronid (*Res-Glc*), resveratrol-sulfát (*Res-SO₃H*) a dihydroresveratrol (*DhRes*). V případě aplikovaného vzorku dihydroresveratrolu byly při MS analýze hledány a měřeny dihydroresveratrol-sulfát (*DhRes-SO₃H*), dihydroresveratrol-glukuronid (*DhRes-Glc*), *cis*-resveratrol (*Cis-Res*), *trans*-resveratrol (*Trans-Res*) a samotný dihydroresveratrol (*DhRes*).

Obrázek 5, Obrázek 7 a Obrázek 9 znázorňují výsledky analýzy těchto látek na bazolaterální straně inserty pomocí UHPLC/Q-TOF MS. Osa *y* znázorňuje intenzitu analyzované látky změřenou MS analýzou. Osa *x* znázorňuje časový průběh v hodinách, kdy byly vzorky pro MS analýzu odebírány. Čas 0 hod označuje čas aplikace zkoumaného vzorku na apikální stranu buněk. Poslední vzorek byl z bazolaterální části odebrán 4 hodiny po aplikaci látky.

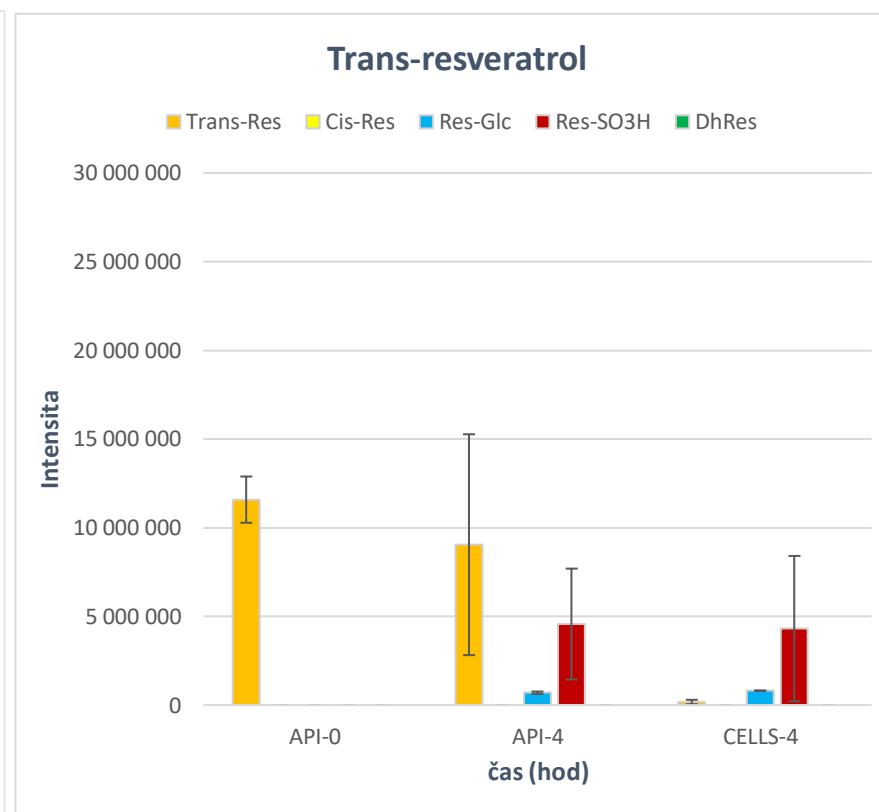
Odběr vzorků pro analýzu proběhl také na apikální straně inserty v časech 0 hod a 4 hod. Na konci pokusu byly odebrány i samotné Caco-2 buňky pro analýzu hledaných látek intracelulárně. Obrázek 6, Obrázek 8 a Obrázek 10 znázorňují výsledky analýzy těchto vzorků odebraných apikálně a také výsledky analýzy vzorků samotných buněk. Osa *y* znázorňuje intenzitu analyzované látky změřenou pomocí MS a osa *x* znázorňuje čas a místo odběru vzorku. API-0 označuje vzorek odebraný v čase 0 hod z apikální části inserty. API-4 označuje vzorek odebraný z apikální části inserty v čase 4 hod. CELLS-4 označuje vzorek samotných buněk odebraný v čase 4 hod.

5.1 Trans-resveratrol



Obrázek 5: Obsah látek v bazolaterární části po aplikaci trans-resveratrolu

Počet biologických opakování: $n=3$



Obrázek 6: Obsah látek v apikální části a intracelulárně po aplikaci trans-roesveratrolu

Počet biologických opakování: $n=3$

(API-0) Apikální část inserty v čase 0 hod; (API-4) Apikální část inserty v čase 4 hod; (CELLS-4) Intracelulární část v čase 4 hod

5.1.1 Bazolaterální strana inserty

Výsledky MS analýzy vzorků z bazolaterální části inserty po aplikaci *trans*-resveratrolu znázorňuje Obrázek 5. Nalezeny byly na bazolaterální straně hledané látky *trans*-resveratrol, resveratrol-sulfát a resveratrol-glukuronid. Zbylé hledané látky *cis*-resveratrol a dihydroresveratrol nebyly nalezeny.

Nejvyšších intenzit dosahoval *trans*-resveratrol. Intenzita *trans*-resveratrolu se v čase poměrně rovnoměrně zvyšovala, ovšem mezi časy 1 a 1,5 hod došlo ke strmějšímu stoupání, za nímž následoval pokles mezi následujícími časy 1,5 a 2 hod. Následně intenzita *trans*-resveratrolu pokračovala v poměrně rovnoměrném růstu. Maxima dosáhla v čase 4 hod, a to intenzitou přes 20 milionů, což je nejvyšší intenzita z nalezených látek po aplikaci *trans*-resveratrolu.

Druhou nejvyšší intenzitu dosahoval derivát resveratrol-sulfát. Jeho průběh intenzity byl podobný jako u *trans*-resveratrolu. Intenzita stoupala v čase rovnoměrně, kromě vyššího nárůstu mezi časy 1 a 1,5 hod s následujícím poklesem mezi časy 1,5 a 2 hod. Výška intenzity byla celkově přibližně 3krát nižší než intenzita *trans*-resveratrolu. Maxima dosáhla také v čase 4 hod.

Poslední nalezenou látkou byl resveratrol-glukuronid. Tento derivát *trans*-resveratrolu dosahoval nejnižších intenzit, a to dokonce řádově. Jeho naměřená intenzita byla přibližně o dva řády nižší než intenzita *trans*-resveratrolu. Intenzita se v čase rovnoměrně zvyšovala a maxima dosáhla v čase 4 hod.

5.1.2 Apikální strana inserty a intracelulární obsah hledaných látek

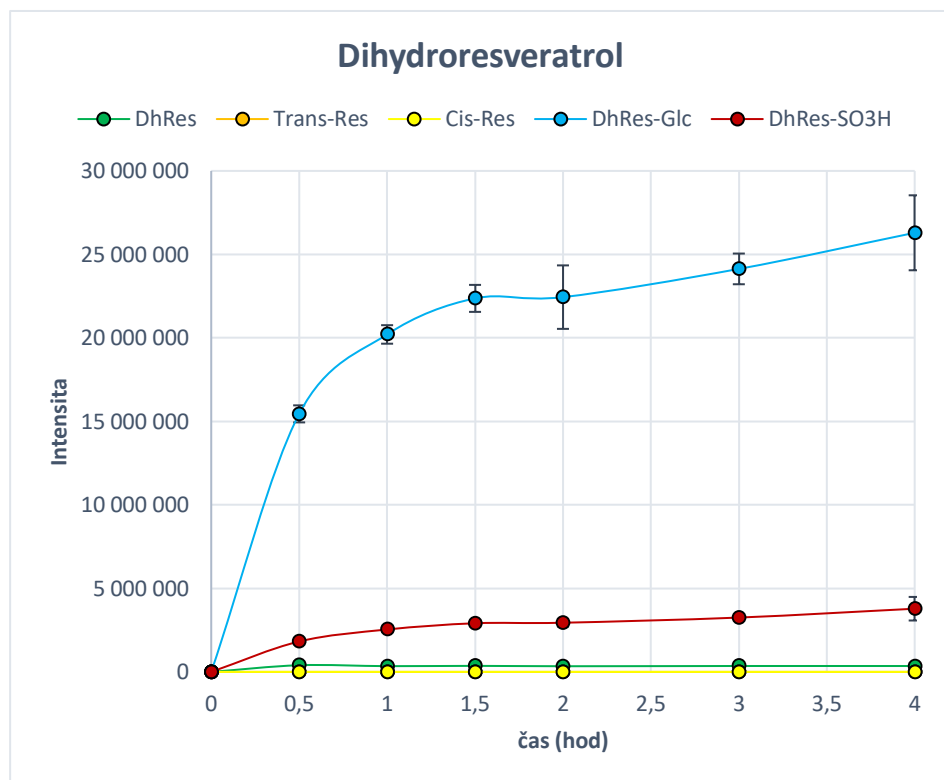
Výsledky analýzy vzorků samotných buněk a vzorků odebraných z apikální části inserty zobrazuje Obrázek 6. Celkově byly v těchto vzorcích nalezeny stejné látky jako na bazolaterální straně inserty, a to *trans*-resveratrol, resveratrol-sulfát a resveratrol-glukuronid. Ostatní hledané látky *cis*-resveratrol a dihydroresveratrol nalezeny nebyly.

V čase 0 hod (API-0) byl nalezen pouze námi aplikovaný *trans*-resveratrol. Velikost naměřené intenzity je přibližně poloviční než maximální dosažená intenzita této látky na bazolaterální straně inserty. Zároveň je to však nejvyšší naměřená intenzita ze všech nalezených látek na apikální straně i intracelulárně.

V čase 4 hod (API-4) byly na apikální straně nalezeny stejné tři látky jako na straně bazolaterální, tedy *trans*-resveratrol, resveratrol-glukuronid a resveratrol-sulfát. Poměr dosažených intenzit mezi těmito třemi látkami byl podobný jako na bazolaterální straně inserty. Nejvyšší intenzita v tomto čase byla naměřena u *trans*-resveratrolu, a to přibližně 1krát menší než bazolaterálně ve stejný čas. Intenzita resveratrol-sulfátu byla přibližně poloviční než maximální intenzita stejné látky na bazolaterální straně. Nejnižší intenzita byla naměřena u resveratrol-glukuronidu a odpovídala téměř stejné velikosti jako maximální intenzita této látky na bazolaterální straně.

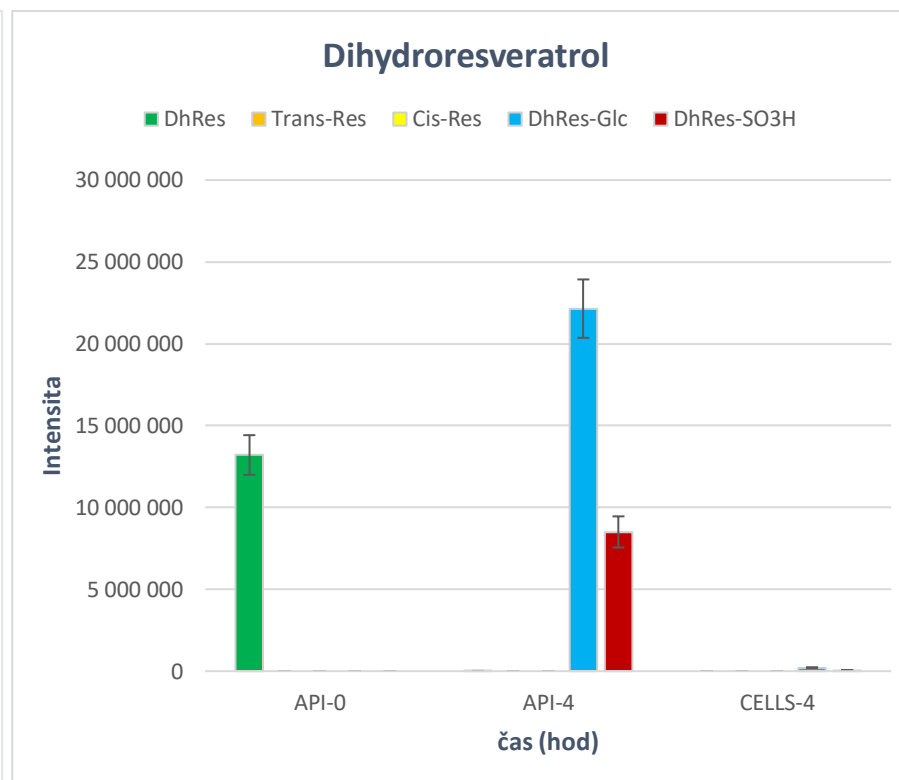
Intracelulárně (CELLS-4) byly nalezeny také stejné tři látky jako v čase API-4 a jako v grafu na Obrázku 5 na bazolaterální straně inserty tedy *trans*-resveratrol, resveratrol-glukuronid a resveratrol-sulfát. Velikost intenzity resveratrol-sulfátu a resveratrol-glukuronidu byla prakticky stejná jako v čase API-4 u těchto látek. Naopak intenzita *trans*-resveratrolu byla minimální, o 3 řády nižší než hodnoty naměřené v předchozích časech. Tato intenzita je v měřítku grafu tak nízká, že není téměř patrná.

5.2 Dihydroresveratrol



Obrázek 5: Obsah látek v bazolaterární části po aplikaci dihydroresveratrolu

Počet biologických opakování: $n=5$



Obrázek 6: Obsah látek v apikální části a intracelulárně po aplikaci dihydroresveratrolu

Počet biologických opakování: $n=5$

(API-0) Apikální část inserty v čase 0 hod; (API-4) Apikální část inserty v čase 4 hod; (CELLS-4) Intracelulární část v čase 4 hod

5.2.1 Bazolaterální strana inserty

Výsledky MS analýzy vzorků z bazolaterální části inserty po aplikaci dihydroresveratrolu znázorňuje Obrázek 7. Nalezeny byly na bazolaterální straně hledané látky dihydroresveratrol, dihydroresveratrol-glukuronid a dihydroresveratrol-sulfát. Zbylé hledané látky *cis*-resveratrol a *trans*-resveratrol nebyly nalezeny.

Nejvyšších hodnot intenzity dosahoval dihydroresveratrol-glukuronid. Velikost intenzity v čase rostla, avšak nerovnoměrně. Nejstrmější nárůst intenzity byl zaznamenán hned na začátku mezi časy 0 a 0,5 hod, kdy intenzita za tento časový úsek dosáhla více než poloviny své maximální hodnoty. V následujících časových úsecích již nebyl nárůst intenzity tak markantní. Mezi časy 1,5 a 2 hod dokonce velikost intenzity stagnovala. V následujících časech došlo ještě k lehkém zvýšení. Maximální intenzity bylo dosaženo v čase 4 hod, a to o velikosti přes 25 milionů.

Vývoj velikosti intenzity dihydroresveratrol-sulfátu měl podobný časový průběh jako u dihydroresveratrol-glukuronidu. Nejstrmější nárůst proběhl na začátku měření mezi časy 0 a 0,5 hod a 0,5 a 1 hod. V těchto časových intervalech dosáhla velikost intenzity více než poloviny hodnoty maximální dosažené intenzity této látky. Následně již intenzita rostla velmi pozvolna a maxima dosáhla v čase 4 hod. Navzdory podobnému průběhu dosahovala intenzita dihydroresveratrol-sulfátu přibližně 6,5krát nižší intenzity než u dihydroresveratrol-glukuronidu.

Intenzita samotného dihydroresveratrolu dosahovala nejnižších hodnot ze tří nalezených látek na bazolaterální straně. Celkově dosahovala přibližně 74krát nižších hodnot než nalezená látka s nejvyšší intenzitou dihydroresveratrol-glukuronid. Maximální intenzity bylo u dihydroresveratrolu dosaženo hned na začátku v čase 0,5 hod. Následně se intenzita držela na přibližně stejných hodnotách až do posledního měření v čase 4 hod.

5.2.2 Apikální strana inserty a intracelulární obsah hledaných látek

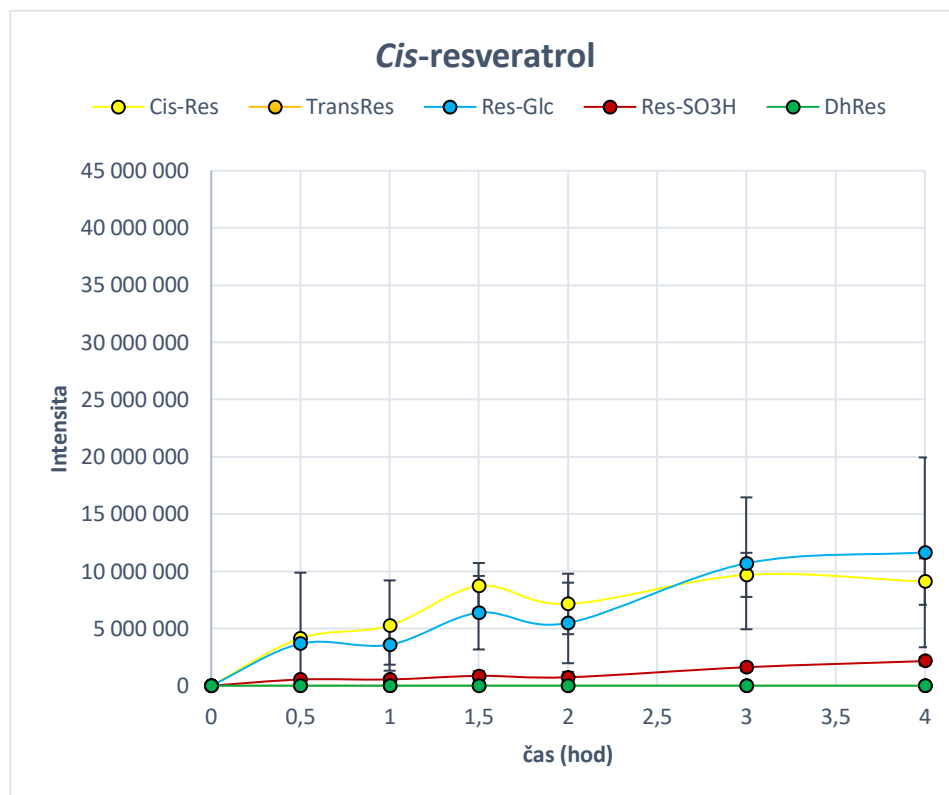
Výsledky analýzy vzorků samotných buněk a vzorků odebraných z apikální části inserty zobrazuje Obrázek 8. Celkově byly v těchto vzorcích nalezeny stejné látky jako na bazolaterální straně inserty, a to dihydroresveratrol, dihydroresveratrol-sulfát a dihydroresveratrol-glukuronid. Ostatní hledané látky *cis*-resveratrol a *trans*-resveratrol nalezeny nebyly.

V čase 0 hod (API-0) byl nalezen pouze námi aplikovaný dihydroresveratrol. Velikost naměřené intenzity je přibližně poloviční než maximální dosažená intenzita nejvyšší látky na bazolaterální straně dihydroresveratrol-glukuronidu.

V čase 4 hod (API-4) byly nalezeny především deriváty aplikované látky dihydroresveratrol-glukuronid a dihydroresveratrol-sulfát. Podobně jako na bazolaterální straně dosáhl nejvyšší intenzity dihydroresveratrol-glukuronid, který dosáhl téměř stejné intenzity jako na již zmíněné bazolaterální straně. Intenzita dihydroresveratrol-sulfátu dosahuje sice přibližně třetinové hodnoty než dihydroresveratrol-glukuronidu, ale ve srovnání s hodnotami na bazolaterální straně jsou to hodnoty téměř dvakrát vyšší. Určitá intenzita byla naměřena i pro nekonjugovaný dihydroresveratrol, ovšem zcela zanedbatelné velikosti, tak že na grafu není vůbec patrná.

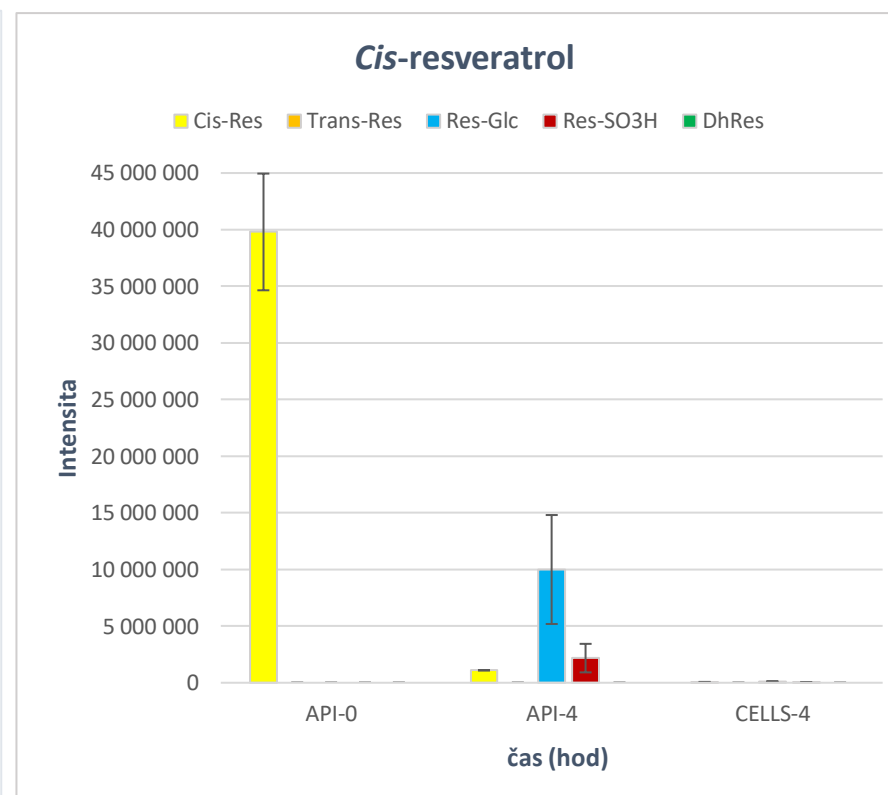
Intracelulárně (CELLS-4) byly nalezeny pouze deriváty dihydroresveratrol-sulfát a dihydroresveratrol-glukuronid. Intenzity obou těchto látek byly až řádově nižší oproti všem ostatním naměřeným intenzitám. Intenzity jsou tak nízké, že v měřítku grafu na Obrázku 8 nejsou téměř patrné. Určitá intenzita byla naměřena i pro nekonjugovaný dihydroresveratrol, ovšem tak malé velikosti, že na grafu není vůbec patrná.

5.3 Cis-resveratrol



Obrázek 7: Obsah látek v bazolaterární části po aplikaci cis-resveratrolu

Počet biologických opakování: $n=3$



Obrázek 8: Obsah látek v apikální části a intracelulárně po aplikaci cis-resveratrolu

Počet biologických opakování: $n=3$

(API-0) Apikální část inserty v čase 0 hod; (API-4) Apikální část inserty v čase 4 hod; (CELLS-4) Intracelulární část v čase 4 hod

5.3.1 Bazolaterální strana inserty

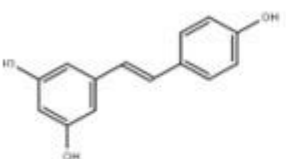
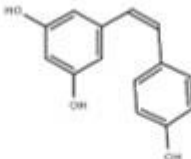
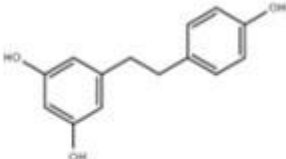
Výsledky MS analýzy vzorků z bazolaterální části inserty po aplikaci *cis*-resveratrolu znázorňuje Obrázek 9. Nalezeny byly na bazolaterální straně: *cis*-resveratrol, resveratrol-glukuronid a resveratrol-sulfát. Nejvyšších intenzit dosahovaly *cis*-resveratrol a resveratrol-glukuronid. Velikost intenzit obou těchto látek je podobná a také má podobný časový průběh. Intenzita se s postupujícím časem nelineárně zvyšuje. Nicméně mezi časy 0,5 a 1 hod dochází v případě resveratrol-glukuronidu k mírnému snížení intenzity. Podobné snížení intenzity dochází jak u resveratrol-glukuronidu, tak u *cis*-resveratrolu mezi časy 1,5 a 2 hod. Nejvyšší intenzity dosahuje hladina *cis*-resveratrolu v čase 3 hod. Resveratrol-glukuronid dosahuje nejvyšší intenzity v čase 4 hod a zároveň tak dosahuje nejvyšší intenzity ze všech tří nalezených látek. Intenzita třetí nalezené látky resveratrol-sulfátu dosahuje oproti přechozím dvěma látkám přibližně 3,5krát nižších hodnot. Časový průběh intenzity má lineárnější charakter. Maxima dosahuje intenzita resveratrol-sulfátu v čase 4 hod. Konfigurační izomer aplikovaného *cis*-resveratrolu *trans*-resveratrol a derivát dihydro-resveratrol nebyly v odebraných vzorcích vůbec nalezeny.

5.3.2 Apikální strana inserty a intracelulární obsah hledaných látek

Výsledky analýzy vzorků samotných buněk a vzorků odebraných z apikální části inserty zobrazuje Obrázek 10. V čase 0 hod na apikální straně (API-0) byl nalezen pouze námi aplikovaný *cis*-resveratrol v intenzitě 4krát vyšší, než byla nejvyšší dosažená intenzita na bazální straně inserty. V čase 4 hod (API-4) byly na apikální straně nalezeny stejné tři látky jako na straně bazální, tedy *cis*-resveratrol, resveratrol-glukuronid a resveratrol-sulfát. Intenzita *cis*-resveratrolu v čase 4 hod byla velmi nízká a zároveň nejnižší ze tří nalezených látek. Oproti intenzitě v čase 0 hod klesla na apikální straně intenzita *cis*-resveratrolu v čase 4 hod 40krát. Intenzita resveratrol-sulfátu byla na apikální straně 4 hod srovnatelná s intenzitou na bazální straně inserty ve stejný čas. Stejně tak intenzita resveratrol-glukuronidu dosahovala v čase 4 hod podobných hodnot jako na bazolaterální straně inserty ve stejný čas. Intracelulárně (CELLS-4) byly nalezeny také stejné tři látky jako v čase API-4 a jako v grafu na Obrázku 9 na bazolaterální straně inserty, tedy *cis*-resveratrol, resveratrol-glukuronid a resveratrol-sulfát. Nicméně intenzity všech naměřených látek byly nižší až řádově oproti všem ostatním naměřeným intenzitám. Intenzity jsou tak nízké, že v měřítku grafu nejsou téměř patrné.

6 Diskuze

Tabulka 3: Procentuální zastoupení detekovaných látek v čase 4 hod bazolaterálně (BL), apikálně (APIK) a intracelulárně (CELL)

Trans-Res				Cis-Res				DhRes			
											
[%]	BL	APIK	CELL	[%]	BL	APIK	CELL	[%]	BL	APIK	CELL
Trans-Res:	72	63	3	Cis-Res:	40	8	24	DhRes:	1	0	0
Res-Glc:	3	5	15	Res-Glc:	51	75	60	Dhres-Glc:	86	72	80
Res-SO3H:	25	32	82	Res-SO3H:	9	17	16	DhRes-SO3H:	13	23	20
Celkem:	100	100	100	Celkem:	100	100	100	Celkem:	100	100	100

6.1 Trans-resveratrol

Z výsledků našeho experimentu na Caco-2 buněčné linii simulující střevní sliznici vyplývá, že po čtyřech hodinách se na bazolaterální straně inserty s Caco-2 buňkami nacházelo přibližně 72 % *trans*-resveratrolu, 25 % resveratrol-sulfátu a pouze 3 % resveratrol-glukuronidu, jak je zobrazeno výše v Tabulce 3. Li et al (2003) prováděli velmi podobný experiment, kde také inkubovali *trans*-resveratrol shodně po dobu 4 hodin na Caco-2 buňkách a postupně odebírané vzorky analyzovali také pomocí LC/MS. Výsledky jejich práce jsou velmi podobné našim výsledkům. Porovnání zobrazuje Tabulka 4. Výsledky obou prací shodně ukazují, že většinu látky nacházející se na bazolaterální straně inserty tvoří samotný *trans*-resveratrol, druhou v pořadí dle míry zastoupení je resveratrol-sulfát a až třetí resveratrol-glukuronid. Ačkoli velikost procent stanovených látek se neshoduje přesně, trend je v obou případech stejný. Z výsledků vyplývá, že *trans*-resveratrol prochází Caco-2 buňkami z apikální na bazolaterální stranu z většinové části bez úpravy intracelulárními enzymy metabolismu fáze II. Pouze menší část je během průchodu skrz buňky konjugována, a to dominantně sulfatací, pouze minimální část je glukuronidována. Výsledky v této podobě by znamenaly, že metabolismus *trans*-resveratrolu během intestinální absorpce po perorálním podání by neměl představovat výraznou bariéru pro biologickou dostupnost *trans*-resveratrolu.

Tabulka 4: Porovnání výsledků obsahu analyzovaných látek na bazolaterální straně inserty našeho experimentu a experimentu Li et al (2003)

Analyzovaná látka	Přibližné procento z celkového obsahu analyzovaných látek na bazolaterální straně inserty	
	Náš experiment	Experiment Li et al (2003)
<i>Trans</i> -resveratrol	72 %	85 %
Resveratrol-sulfát	25 %	10 %
Resveratrol-glukuronid	2 %	5 %
Celkem	100 %	100 %

(Li et al. 2003)

Nicméně výsledky dalších studií, jako například na izolovaném modelu střevní perfuze u potkanů, jsou odlišné od výsledků na Caco-2 buněčné linii. Ukazují, že u potkanů je hlavním produktem přenášeným přes střevní epitel glukuronid mateřského resveratrol-aglykonu (Kuhnle et al. 2000). Model střevní perfuze je sice bližší *in vivo* situaci, zároveň je však prováděn na odlišném živočišném druhu. Rozdíl mezi výsledky na Caco-2 buňkách a na modelu střevní perfuze u potkana tak může být dán mezidruhovými rozdíly konjugačních enzymů střevních buněk.

V současné době již existují i výsledky studií na lidech po orálním podání resveratrolu. Tyto výsledky ukazují velmi nízký až nulový obsah nekonjugovaného resveratrolu v plazmě (Walle et al. 2004). Takto významný rozdíl výsledků mezi studií na Caco-2 buněčné linii a na lidech může být způsoben právě odlišnými podmínkami experimentu. V tomto případě jsou samozřejmě z hlediska výsledného obsahu resveratrolu v plazmě výsledky experimentu *in vivo* na lidech nejrelevantnější. Ovšem pokud je naším cílem zjištění způsobu metabolismu resveratrolu přímo a pouze uvnitř buněk střevní sliznice, je model Caco-2 buněčné linie vhodným nástrojem. Při studii *in vivo* na lidech nelze určit (při perorálním podání resveratrolu a odběru krve z periferní žíly), zda minimální obsah volného resveratrolu v plazmě je příčinou především metabolismu uvnitř buněk střevní sliznice, nebo buněk jiné tkáně, například jater. Studie *in vivo* na lidech provedená Walle et al (2004) umožňuje porovnat výsledky po perorálním a po intravenózním podání *trans*-resveratrolu. Ukazují, že k minimálnímu obsahu volného resveratrolu v plazmě dochází v obou způsobech podání resveratrolu. Při porovnání těchto výsledků s výsledky našeho experimentu je proto možné uvažovat o tom, že hlavní

příčinou konjugace resveratrolu není metabolismus uvnitř střevních buněk, nýbrž buněk jiných tkání, především jater.

Intenzita konjugovaného resveratrol-sulfátu v čase rostla. Po čtyřech hodinách byl Res-SO₃H přítomen nejenom bazolaterálně, ale i intracelulárně a apikálně. Intracelulární i apikální intenzita byla přibližně poloviční než intenzita bazolaterální. Apikální přítomnost Res-SO₃H vypovídá o obousměrném transportu sulfatovaného konjugátu s převahou ve směru z apikální na bazolaterální stranu. Velmi podobné jsou i výsledky Res-Glc konjugátu. Intenzita Res-Glc bazolaterálně a apikálně v čase 4 hod je téměř stejná, což vypovídá o vyrovnaném transportu této látky obousměrně.

Zajímavý byl téměř nulový obsah *trans*-resveratrolu po 4 hod intracelulárně. Takový výsledek může být vysvětlen intenzivním aktivním transportem *trans*-resveratrolu z buňky, který již byl popsán ve studii Henry et al. (2005), kde byl jako zodpovědný transportér identifikován MRP2. Zcela odlišný výsledek ale zaznamenal Kaldas et al. (2003), kde byl intracelulárně detekován vysoký obsah *Trans*-Res. Nicméně jejich analýza buněk proběhla již 1 hodinu po aplikaci *Trans*-Res, zatímco my jsme intracelulární obsah analyzovaly až 4 hodiny po aplikaci. Zároveň koncentrace aplikovaného *Trans*-Res byla v našem případě 2krát vyšší. Právě vyšší koncentrace aplikovaného vzorku vede ke zvýšení transportu látky ven z buňky (Kaldas et al. 2003). Takto silný transport resveratrolu vně z buněk, který je výsledkem našeho experimentu, by mohl bránit jeho potenciálním ochranným účinkům na enterocyty.

Při experimentu s aplikací *trans*-resveratrolu byl kromě nalezených Res-SO₃H a Res-Glc hledán také konfigurační izomer *cis*-resveratrol, který se nepodařilo nalézt v žádném čase. *Trans*-Res je tedy stabilní a nepodléhá izomerizaci ani při průchodu buňkami střevní sliznice.

Nalezen nebyl ani hledaný dihydroresveratrol, k hydrogenaci můstku tedy uvnitř střevních buněk také nedochází.

6.2 Dihydroresveratrol

Zajímavé výsledky přinesla aplikace DhRes. V našem experimentu byl DhRes nejrozsáhleji metabolizován z námi aplikovaných látek. Konjugována byla jeho naprostá většina. Intenzita nekonjugovaného DhRes byla sice detekována, ale v téměř zanedbatelné míře proti velikosti intenzity jeho konjugátů (kromě času 0 při aplikaci Dh-Res). Hlavním metabolitem byl glukuronidový konjugát, který dosáhl nejvyšší intenzity ze všech detekovaných látek

bazolaterálně, a to i v porovnání s analýzou metabolitů *cis* a *trans*-resveratrolu. Sulfátový konjugát byl přítomen na bazolaterální straně v čase 4 hod v intenzitě přibližně 7krát nižší než intenzita glukuronidového konjugátu.

Vzhledem k tomu, že podmínky experimentu byly pro každou aplikovanou látku stejné, je pravděpodobné, že za takto rozsáhlý metabolismus fáze II mohou lepší vlastnosti DhRes pro splnění podmínek substrátové specifity UDP-glukuronyltransferáz (UGT) uvnitř buněk. Spojení dvou aromatických kruhů DhRes je na rozdíl od izomerů resveratrolu zajištěno pouze jednoduchými vazbami, které by molekule mohly umožnit snadněji rotovat a napodobovat *cis* nebo *trans* konformaci. Změna konformace nebo lehké změny vazebných úhlů v molekule by mohly umožnit molekule DhRes lépe vyhovět různým pozicím aktivních míst u různých typů přítomných UGT v buňce. Sabolovic et al. (2006) uvádí, že UGT přítomné v mikrozomech připravených z Caco-2 buněk účinněji konjugovaly *cis* formu resveratrolu. Pokud by tedy DhRes byl schopen konfiguračně vyhovět UGT jak upřednostňujícím *cis* konfiguraci, tak *trans* konfiguraci, mohlo by to být vysvětlením pro jeho vysokou glukuronidaci. Pro více informací by bylo dobré provést LC/MS/MS analýzu, která by odhalila přesnou pozici konjugátů na hydroxylových skupinách a porovnat poměry těchto konjugátů. Vysoká míra konjugace také může bránit potenciálním pozitivním účinkům DhRes v cílových tkáních. Nicméně poznání biologických účinků DhRes je teprve na nízké úrovni.

Vysoká intenzita DhRes-Glc byla detekována také apikálně a dosahovala přibližně 85% maximální intenzity DhRes-Glc bazolaterálně. Apikálně byl detekován i DhRes-SO₃H. Poměr těchto látek detekovaných apikálně je přibližně 7:3 (DhRes-Glc:DhRes-SO₃H). Vzhledem k tomu, že intracelulárně bylo detekováno pouze přibližně 1 % obou těchto konjugátů, pravděpodobně dochází k účinnému aktivnímu transportu obou metabolitů apikálním směrem, což by mohlo výrazně snížit absorpci DhRes do krevního oběhu. Zároveň by tento transport mohl zabránit potenciálním příznivým účinkům uvnitř enterocyty.

Po aplikaci DhRes jsme se pokusili detekovat také *cis* a *trans*-resveratrol. Jejich přítomnost nebyla v našem experimentu nalezena. DhRes proto pravděpodobně není pro střevní buňky, ani pro krevní oběh zdrojem resveratrolu.

6.3 *Cis-resveratrol*

Výsledky po aplikaci *Cis-Res* ukazují, že *Cis-Res* je preferovaně konjugován s kyselinou glukuronovou. Intenzita glukuronidu byla po čtyřech hodinách inkubace přibližně 6krát vyšší než intenzita sulfátů. V tomto ohledu se metabolismus *Cis-Res* podstatně liší od svého konfiguračního izomeru *Trans-Res*, který byl v našem experimentu naopak přednostně konjugován kyselinou sírovou. Dostupná studie na Caco-2 buňkách Sabolovic et al. (2006) ukazuje shodné výsledky ve smyslu preference glukuronových konjugátů *cis* izomeru. Oproti tomu při experimentu za použití mikrozomů buněk trávicího traktu byly výsledky variabilní podle dárce a nebyly tak jednoznačné jako při našem experimentu na Caco-2 buněčné linii. Tyto rozdíly mohou být důsledkem odlišné exprese izoform UGT v Caco-2 buňkách a ve střevech. Ze studie Aumont et al. (2001) vyplývá, že UGT1A1 preferuje konjugaci *trans* formy, zatímco UGT1A6 preferuje konjugaci *cis* formy resveratrolu. Příčinou zvýšené glukuronidace *Cis-Res* v Caco-2 buňkách by tak mohla být nižší exprese UGT1A1.

Apikálně se po čtyřech hodinách inkubace nacházelo přibližně 12 % intenzity *Cis-Res* jako ve stejný čas bazolaterálně. Výsledky tedy neukazují výrazný efflux *Cis-Res*, což je důležitý předpoklad pro lepší biologickou dostupnost *Cis-Res* v krevním oběhu. V tomto směru se transport *cis* a *trans* formy resveratrolu také liší. Je tedy možné, že právě odlišné konformační uspořádání molekuly resveratrolu je určující pro přenos transportérem MRP2, který dle Henry et al. (2005) nese největší odpovědnost za efflux *Trans-Res* ven z Caco-2 buněk. Efflux konjugátů *Cis-Res* se naopak ukazuje být stejně účinný jako jejich transport v bazolaterálním směru, což by *in vivo* snižovalo biologickou dostupnost *Cis-Res* konjugátů v krevním oběhu.

Intracelulárně byla detekována zcela minimální intenzita *Cis-Res* a jeho konjugátů, což vypovídá o velmi účinném aktivním transportu těchto látek ven z buňky, ať už ve směru apikálním nebo bazolaterálním. Zároveň to může vylučovat jejich potenciální biologický účinek uvnitř buněk.

Detekované látky *Trans-Res* a DhRes nebyly nalezeny. Víme tedy, že *Cis-Res* není uvnitř Caco-2 buněk přeměňován na žádnou z těchto látek.

7 Závěr

V této práci byly otestovány vzorky *trans*-resveratrolu, jeho metabolitu dihydroresveratrolu a konfiguračního izomeru *cis*-resveratrolu na Caco-2 buněčné linii sloužící jako *in vitro* model střevní sliznice. Cílem práce bylo zjistit a porovnat metabolismus fáze II těchto molekul uvnitř střevních buněk v závislosti na struktuře jejich molekuly. Předpokládali jsme, že strukturální změny molekuly resveratrolu povedou v modelu střevního epitelu ke změně poměrů jeho konjugátů.

Výsledky našeho experimentu ukazují, že metabolismus konfiguračních izomerů resveratrolu vede k různým poměrům sulfátových a glukuronidových konjugátů. Hlavním konjugátem *trans*-resveratrolu byl detekován sulfát, zatímco u *cis*-resveratrolu byl hlavním konjugátem detekován glukuronid. Příčinou je pravděpodobně substrátová specifita exprimovaných typů glukuronyltransferáz a sulfotransferáz na základě konfigurace substrátu. Dihydroresveratrol obsahující ethanový můstek podstoupil během intracelulárního metabolismu nejrozsáhlejší konjugaci ze tří analyzovaných vzorků. Konjugace vedla dominantně ke vzniku glukuronidu. Příčinou rozsáhlé konjugace může být volnější otáčivost přítomné jednoduché vazby a lepší přizpůsobení substrátové specifitě především glukuronyltransferáz. Intracelulárně nebyla detekována podstatná intenzita žádné ze tří aplikovaných molekul, což vylučuje střevní buňky jako cílový orgán biologické aktivity těchto látek, nicméně tento parametr lze pravděpodobně ovlivnit koncentrací aplikovaných látek.

Tyto výsledky jasně ukazují, že poměry konjugátů každé z aplikovaných látek byly odlišné. Molekuly se liší především ve struktuře. Protože experiment probíhal u všech tří aplikovaných látek za stejných podmínek a látky byly aplikovány ve stejné koncentraci, mohou být rozdíly ve vzniku odlišného poměru konjugátů důsledkem právě této strukturální rozdílnosti. Hypotéza byla potvrzena.

8 Literatura

- Adesanya SA, Ogundana SK, Roberts MF. 1989. Dihydrostilbene phytoalexins from *Dioscorea bulbifera* and *D. dumentorum*. *Phytochemistry* **28**:773–774.
- Artursson P, Palm K, Luthman K. 2001. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Advanced Drug Delivery Reviews* **46**:27–43.
- Aumont V, Krisa S, Richard T, Mérillon JM, Battaglia E, Netter P, Magdalou J, Sabolovic N. 2001. Regioselective and stereospecific glucuronidation of trans- and cis-resveratrol in human. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **393**:281–289.
- Balimane P V., Chong S. 2005. Cell culture-based models for intestinal permeability: A critique. *Drug Discovery Today* **10**:335–343.
- Barthe L, Woodley J, Houin G. 1999. Gastrointestinal absorption of drugs: Methods and studies. *Fundamental and Clinical Pharmacology* **13**:154–168.
- Basly JP, Marre-Fournier F, Bail JC Le, Habrioux G, Chulia AJ. 2000. Estrogenic/antiestrogenic and scavenging properties of (E)- and (Z)- resveratrol. *Life Sciences* **66**:769–777.
- Borra MT, Smith BC, Denu JM. 2005. Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol. *Journal of Biological Chemistry* **280**:17187–17195.
- Brill SS, Furimsky AM, Ho MN, Furniss MJ, Li Y, Green AG, Green CE, Iyer L V., Bradford WW, Kapetanovic IM. 2006. Glucuronidation of trans -resveratrol by human liver and intestinal microsomes and UGT isoforms . *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **58**:469–479.
- Brown VA et al. 2010. Repeat dose study of the cancer chemopreventive agent resveratrol in healthy volunteers: Safety, pharmacokinetics, and effect on the insulin-like growth factor axis. *Cancer Research* **70**:9003–9011.
- Bub A, Franz CMAP, Ruhland D, Bunzel D, Cho G-S, Bode LM, Huch M, Bunzel M, 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.
- Burkon A, Somoza V. 2008. Quantification of free and protein-bound trans-resveratrol metabolites and identification of trans-resveratrol-C/O-conjugated diglucuronides - Two novel resveratrol metabolites in human plasma. *Molecular Nutrition and Food Research* **52**:549–557.

- Burns J, Yokota T, Ashihara H, Lean MEJ, Crozier A. 2002. Plant foods and herbal sources of resveratrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**:3337–3340.
- Catalgol B, Batirel S, Taga Y, Ozer NK. 2012. Resveratrol: French paradox revisited. *Frontiers in Pharmacology* **3 JUL**:1–18.
- Chen X, He H, Wang G, Yang B, Ren W, Ma L, Yu Q. 2007. Stereospecific determination of cis- and trans-resveratrol in rat plasma by HPLC: application to pharmacokinetic studies. *Biomedical chromatography* **21**:257–265.
- de Angelis I, Turco L. 2011. Caco-2 cells as a model for intestinal absorption. *Current Protocols in Toxicology* **47**:1–15.
- Domínguez-Avila JA, Wall-Medrano A, Velderrain-Rodríguez GR, Chen CYO, Salazar-López NJ, Robles-Sánchez M, González-Aguilar GA. 2017. Gastrointestinal interactions, absorption, splanchnic metabolism and pharmacokinetics of orally ingested phenolic compounds. *Food and Function* **8**:15–38.
- Dostálek M, Juřica J, Eva J, Zahradníková L. 2006. *Farmakokinetika*. Grada, Praha.
- Ebara M et al. 2000. Relationship between copper, zinc and metallothionein in hepatocellular carcinoma and its surrounding liver parenchyma. *Journal of Hepatology* **33**:415–422.
- Fossati L, Dechaume R, Hardillier E, Chevillon D, Prevost C, Bolze S, Maubon N. 2008. Use of simulated intestinal fluid for Caco-2 permeability assay of lipophilic drugs. *International Journal of Pharmaceutics* **360**:148–155.
- Franciosa A, Mastromarino P, Masci A, D'Erme M, Mosca L. 2014. Chemistry, Stability and Bioavailability of Resveratrol. *Medicinal Chemistry* **10**:237–245.
- Fritzmeier K, Kindl H. 1983. 9, 10-Dihydrophenanthrenes as Phytoalexins of Orchidaceae. *European Journal of Biochemistry* **133**:545–550.
- Ghaffarian R, Muro S. 2013. Models and Methods to Evaluate Transport of Drug Delivery Systems Across Cellular Barriers. *Journal of Visualized Experiments* **80**:1–13.
- Glahn R. 2009. The use of Caco-2 cells in defining nutrient bioavailability: Application to iron bioavailability of foods. Pages 340–361 in D. McClements and E. Cecker, editors. *Designing Functional Foods: Measuring and Controlling Food Structure Breakdown and Nutrient Absorption*. Woodhead Publishing, Cambridge.
- Hadi SM, Asad SF, Singh S, Ahmad A. 2000. Putative mechanism for anticancer and apoptosis-inducing properties of plant-derived polyphenolic compounds. *IUBMB Life* **50**:167–171.

- Henry C, Vitrac X, Decendit A, Ennamany R, Krisa S, Marillon JM. 2005. Cellular uptake and efflux of trans-piceid and its aglycone trans-resveratrol on the apical membrane of human intestinal Caco-2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**:798–803.
- Hubatsch I, Ragnarsson EGE, Artursson P. 2007. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nature Protocols* **2**:2111–2119.
- 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.
- Juan ME, González-Pons E, Planas JM. 2010. Multidrug Resistance Proteins Restrain the Intestinal Absorption of trans-Resveratrol in Rats. *The Journal of Nutrition* **140**:489–495.
- Kaldas MI, Walle UK, Walle T. 2003. Resveratrol transport and metabolism by human intestinal Caco-2 cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **55**:307–312.
- Kuhnle G, Spencer JPE, Chowrimootoo G, Schroeter H, Debnam ES, Srai SKS, Rice-Evans C, Hahn U. 2000. Resveratrol is absorbed in the small intestine as resveratrol glucuronide. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **272**:212–217.
- Lacerda D et al. 2018. Stilbenoid pterostilbene complexed with cyclodextrin preserves left ventricular function after myocardial infarction in rats: possible involvement of thiol proteins and modulation of phosphorylated GSK-3 β . *Free Radical Research* **52**:988–999.
- Lasa A, Churrua I, Eseberri I, Andrés-Lacueva C, Portillo MP. 2012. Delipidating effect of resveratrol metabolites in 3T3-L1 adipocytes. *Molecular Nutrition and Food Research* **56**:1559–1568.
- Lea T. 2015. Caco-2 Cell Line. Pages 103–111 in K. Verhoeckx, P. Cotter, C. Kleiveland, A. Mackie, and D. Swiatecka, editors. *The Impact of Food Bio-Actives on Gut Health*. Springer.
- Ledvina M, Stoklasová A, Cerman J. 2011. *Biochemie pro studující medicíny I. díl*. Nakladatelství Karolinum, Praha.
- Lee M, Kim S, Kwon O-K, Oh S-R, Lee H-K, Ahn K. 2009. Anti-inflammatory and anti-asthmatic effects of resveratrol, a polyphenolic stilbene, in a mouse model of allergic asthma. *International Immunopharmacology* **9**:418–424.
- Leiro J, Álvarez E, Arranz JA, Laguna R, Uriarte E, Orallo F. 2004. Effects of cis -resveratrol on inflammatory murine macrophages: antioxidant activity and down-regulation of inflammatory genes. *Journal of Leukocyte Biology* **75**:1156–1165.

- Leonard SS, Xia C, Jiang BH, Stinefelt B, Klandorf H, Harris GK, Shi X. 2003. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **309**:1017–1026.
- Li YM, Shin YG, Yu CW, Kosmeder JW, Hirschelman WH, Pezzuto JM, van Breemen RB. 2003. Increasing the throughput and productivity of Caco-2 cell permeability assays using liquid chromatography-mass spectrometry: Application to resveratrol absorption and metabolism. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* **6**:757–767.
- Mackenzie PI, Bock KW, Burchell B, Guillemette C, Ikushiro SI, Iyanagi T, Miners JO, Owens IS, Nebert DW. 2005. Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily. *Pharmacogenetics and Genomics* **15**:677–685.
- Maier-Salamon A, Böhmendorfer M, Riha J, Thalhammer T, Szekeres T, Jaeger W. 2013. Interplay between metabolism and transport of resveratrol. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1290**:98–106.
- Mattagajasingh I, Kim C-S, Naqvi A, Yamamori T, Hoffman T, Jung S, DeRicco J, Kasuno K, Irani K. 2007. SIRT1 promotes endothelium-dependent vascular relaxation by activating endothelial nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**:14855–14860.
- Meunier V, Bourrié M, Berger Y, Fabre G. 1995. The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. *Cell Biology and Toxicology* **11**:187–194.
- Miksits M, Maier-Salamon A, Aust S, Thalhammer T, Reznicek G, Kunert O, Haslinger E, Szekeres T, Jaeger W. 2005. Sulfation of resveratrol in human liver: Evidence of a major role for the sulfotransferases SULT1A1 and SULT1E1. *Xenobiotica* **35**:1101–1119.
- Mishima S, Matsumoto K, Futamura Y, Araki Y, Ito T, Tanaka T, Iinuma M, Nozawa Y, Akao Y. 2003. Antitumor effect of stilbenoids from *Vateria indica* against allografted sarcoma S-180 in animal model. *Journal of Experimental Therapeutics and Oncology* **3**:283–288.
- Miyazaki R, Ichiki T, Hashimoto T, Inanaga K, Imayama I, Sadoshima J, Sunagawa K. 2008. SIRT1, a longevity gene, downregulates angiotensin II type 1 receptor expression in vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **28**:1263–1269.

- Moreno A, Castro M, Falqué E. 2008. Evolution of trans- and cis-resveratrol content in red grapes (*Vitis vinifera* L. cv Mencía, Albarello and Merenzao) during ripening. *European Food Research and Technology* **227**:667–674.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **65**:55–63.
- Neveau V et al. 2010. Phenol-Explorer: Database on polyphenol content in foods. Available from <http://phenol-explorer.eu/compounds> (accessed April 3, 2019).
- Niesen DB, Hessler C, Seeram NP. 2013. Beyond resveratrol: A review of natural stilbenoids identified from 2009-2013. *Journal of Berry Research* **3**:181–196.
- Planas JM, Alfaras I, Colom H, Juan ME. 2012. The bioavailability and distribution of trans-resveratrol are constrained by ABC transporters. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **527**:67–73.
- Quaroni A, Hochman J. 1996. Development of intestinal cell culture models for drug transport and metabolism studies. *Advanced Drug Delivery Reviews* **22**:3–52.
- Rastogi H, Jana S. 2016. Evaluation of physicochemical properties and intestinal permeability of six dietary polyphenols in human intestinal colon adenocarcinoma Caco-2 cells. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* **41**:33–43.
- Richard T, Pawlus AD, Iglésias ML, Pedrot E, Waffo-Teguo P, Mérillon JM, Monti JP. 2011. Neuroprotective properties of resveratrol and derivatives. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1215**:103–108.
- Romero-Pérez AI, Lamuela-Raventós RM, Waterhouse AL, de la Torre-Boronat MC. 2002. Levels of cis - and trans -Resveratrol and Their Glucosides in White and Rosé *Vitis vinifera* Wines from Spain . *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**:2124–2128.
- Rotches-Ribalta M, Andres-Lacueva C, Estruch R, Escribano E, Urpi-Sarda M. 2012. Pharmacokinetics of resveratrol metabolic profile in healthy humans after moderate consumption of red wine and grape extract tablets. *Pharmacological Research* **66**:375–382.
- S. Mohar D. 2012. The Sirtuin System: The Holy Grail of Resveratrol? *Journal of Clinical & Experimental Cardiology* **03**:216–219.
- Sabolovic N, Humbert AC, Radomska-Pandya A, Magdalou J. 2006. Resveratrol is efficiently glucuronidated by UDP-glucuronosyltransferases in the human gastrointestinal tract and in Caco-2 cells. *Biopharmaceutics and Drug Disposition* **27**:181–189.

- Shah P, Jogani V, Bagchi T, Misra A. 2006. Role of Caco-2 cell monolayers in prediction of intestinal drug absorption. *Biotechnology Progress* **22**:186–198.
- Shukla Y, Singh R. 2011. Resveratrol and cellular mechanisms of cancer prevention. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1215**:1–8.
- Šmidrkal J, Filip V, Melzoch K, Hanzlíková I, Buckiová D, Křísa B. 2001. Resveratrol. *Chemické listy* **95**:602–609.
- Stanley LA. 2017. Drug Metabolism. Pages 527–545 in S. Badal and R. Delgoda, editors. *Pharmacognosy*. Academic Press.
- Švíglerová J, Slavíková J. 2013. Fyziologie gastrointestinálního traktu. Page (Sobotka P, Nováková M, editors). Karolinum, Praha.
- Tamboli VF, Re N, Coletti C, Defant A, Mancini I, Tosi P. 2012. A joint experimental and theoretical investigation on the oxidative coupling of resveratrol induced by copper and iron ions. *International Journal of Mass Spectrometry* **319–320**:55–63. .
- Ungell A-L, Karlsson J. 2004. Cell Cultures in Drug Discovery: An Industrial Perspective. Pages 90–131 in H. van de Waterbeemd, H. Lennernas, and P. Artursson, editors. *Drug bioavailability: estimation of solubility, permeability, absorption and bioavailability*. Wiley-VCH.
- University of Alberta. 2017. FoodB. Available from <http://foodb.ca/compounds/FDB031212> (accessed January 2, 2019).
- van Breemen RB, Li Y. 2005. Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* **1**:175–185.
- van Herwaarden AE, van Waterschoot RAB, Schinkel AH. 2009. How important is intestinal cytochrome P450 3A metabolism? *Trends in Pharmacological Sciences* **30**:223–227.
- Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis JE, Walle UK. 2004. HIGH ABSORPTION BUT VERY LOW BIOAVAILABILITY OF ORAL RESVERATROL IN HUMANS. *Drug Metabolism and Disposition* **32**:1377 LP-1382.
- Wang D, Hang T, Wu C, Liu W. 2005. Identification of the major metabolites of resveratrol in rat urine by HPLC-MS/MS. *Journal of Chromatography B* **829**:97–106.
- Wang LX, Heredia A, Song H, Zhang Z, Yu B, Davis C, Redfield R. 2004. Resveratrol glucuronides as the metabolites of resveratrol in humans: Characterization, synthesis, and anti-HIV activity. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **93**:2448–2457.

- Wu JM, Hsieh T chen. 2011. Resveratrol: A cardioprotective substance. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1215**:16–21.
- Yu O, Jez JM. 2008. Nature's assembly line: Biosynthesis of simple phenylpropanoids and polyketides. *Plant Journal* **54**:750–762.
- Zheng LF, Wei QY, Cai YJ, Fang JG, Zhou B, Yang L, Liu ZL. 2006. DNA damage induced by resveratrol and its synthetic analogues in the presence of Cu (II) ions: Mechanism and structure-activity relationship. *Free Radical Biology and Medicine* **41**:1807–1816.

9 Seznam tabulek a obrázků

9.1 Seznam tabulek

<i>Tabulka 1: Shrnutí základních vlastností buněk Caco-2</i>	18
Tabulka 2: Seznam stilbenoidů pozorovaných a detekovaných ve vzorcích pomocí LC/MS ...	25
Tabulka 3: Procentuální zastoupení detekovaných látek v čase 4 hod bazolaterálně (BL), apikálně (APIK) a intracelulárně (CELL)	35
Tabulka 4: Porovnání výsledků obsahu analyzovaných látek na bazolaterální straně inserty našeho experimentu a experimentu Li et al (2003).....	36

9.2 Seznam obrázků

Obrázek 1: Nejznámější stilbeny	4
Obrázek 2: Konfigurační izomery resveratrolu a dihydroresveratrol	7
Obrázek 3: Schéma možností transportu látek dovnitř buněk.....	11
Obrázek 4: Schéma růstu Caco-2 buněk na transwellové vložce v testovací komoře	20
Obrázek 5: Obsah látek v apikální části a intracelulárně po aplikaci	27
Obrázek 6: Obsah látek v bazolaterární části po aplikaci trans-resveratrolu.....	27
Obrázek 7: Obsah látek v bazolaterární části po aplikaci dihydroresveratrolu	30
Obrázek 8: Obsah látek v apikální části a intracelulárně po aplikaci dihydroresveratrolu	30
Obrázek 9: Obsah látek v bazolaterární části po aplikaci cis-resveratrolu.....	33
Obrázek 10: Obsah látek v apikální části a intracelulárně po aplikaci	33

10 Seznam použitých zkratek a symbolů

ABC transportér:	ATP Binding Cassette transporter = ATP vázající proteinový transportér
API-0:	Apikální strana inserty v čase 0 hodin
API-4:	Apikální strana inserty v čase 4 hodiny
ATCC:	Americké databáze typových kultur
ATP:	Adenosintrifosfát
BCRP:	Breast Cancer Resistance Protein = protein rezistence proti rakovině prsu
CELLS-4:	Intrecelulární obsah v čase 4 hodiny
<i>Cis</i> -Res:	<i>cis</i> -resveratrol
DhRes:	dihydroresveratrol
DhRes-Glc:	dihydroresveratrol-glukuronid
DhRes-SO ₃ H:	dihydroresveratrol-sulfát
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO:	dimetylsulfoxidem
ECACC:	Evropská sbírka buněčných kultur
EGFR:	Epidermal growth factor receptor = epidermální růstový faktor
FBS:	fetální bovinní sérum
GIT:	gastrointestinální trakt
GLUT:	glucose transporters = glukózový transportér
HBSS:	Hanks' Balanced Salt solution
IC ₅₀ :	half maximal inhibitory concentration = inhibiční koncentrace
IGF:	insuline-like growth factor = inzulinu podobný růstový faktor
EC ₅₀ :	half maximal effective concentration = účinná koncentrace
IL:	interleukiny
LC/MS:	kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií
LDL:	Low density lipoprotein = nízkodenzitní lipoprotein
MDCK:	Buněčná linie Madin-Darby canine kidney
MRP:	Multidrug resistance-associated protein = protein pro multilékovou rezistenci
MS:	Mass spektrometry – hmotnostní spektrometrie

NAD:	nikotinamid-adenin-dinukleotid
P-gp:	P-glykoprotein
Q-TOF:	kvadrupól Time-of-Flight
Res:	resveratrol
Res-Glc:	resveratrol-glukuronid
Res-SO ₃ H:	resveratrol-sulfát
ROS	reactive oxygen species = reaktivní formy kyslíku
RPMI:	Roswell Park Memorial Institute
SIRT:	silent information regulator genes
TEER:	trans-epiteliálního elektrického odporu
TNF:	tumor necrosis factor = faktor nádorové nekrózy
<i>Trans-Res:</i>	<i>trans-resveratrol</i>
TSLP:	thymický stromální lymfopoetin
UDP:	uridindifosfát
UGT:	UDP-glukuronyltransferázy
UHPLC:	Ultra High Performance Liquid Chromatography = vysokoúčinná kapalinová chromatografie
VIP:	vazoaktivní intestinální peptid