

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality a bezpečnosti potravin



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Metabolismus složek tymiánové silice modelem trávicího
traktu člověka**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Assemgul Saginayeva

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

Vedoucí práce: Mgr. Petr Maršík Ph.D.

© 2023 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Metabolizmus složek tymiánové silice modelem trávicího traktu člověka" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14. 4. 2023

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala mé vedoucí práce Mgr. Petru Maršíkovi Ph. D. za vedení mé diplomové práce za cenné rady a pomoc při zpracování této diplomové práce, ochotu, trpělivost, vstřícný přístup, věnovaný čas, a za milý, ale profesionální přístup. Dále bych ráda poděkovala Ing. Kateřině Tomisové, Ing. Kateřině Hankové, Ing. Veronice Jarošové, Ph.D. za pomoc při práci v laboratoři, dodání dalších potřebných informací, korekturu práce a velmi milý přístup. Velké poděkování také patří mé dceři, rodině a přátelům za podporu po celou dobu mého studia.

Metabolismus složek tymiánové silice modelem trávicího traktu člověka

Souhrn

Předložená diplomová práce se zaměřuje na vliv antibakteriálních účinků sekundárních metabolitů tymiánu na lidský trávicí systém. Cílem diplomové práce bylo zjistit, zda jsou hlavní složky tymiánové silice metabolizovány při průchodu trávicím traktem a jaké produkty z těchto látek vznikají.

V praktické části metanolový extrakt tymiánu byl vystaven působení simulovaného lidského trávicího systému. Prostředí odpovídající žaludku bylo simulované snížením pH, zatímco působení střevního mikrobiomu bylo zkoumáno pomocí vsádkové anaerobní kultivace testovaných extraktů spolu se stolicí dárce.

Po průchodu simulovaným trávicím traktem bylo zjištěno, že bioaktivní složky tymiánu jsou metabolizovány hlavně ve střevech, zejména v tlustém střeve.

Klíčová slova: Tymián, silice, thymol, thymochinon, střevní mikroflóra.

Metabolism of the components of thyme essential oil by the model of the human digestive tract

Summary

This thesis is dedicated to influence of secondary metabolites in thyme on human digestive system. The aim was to find out if the main compounds of thyme essential oil are metabolised during passage in gastrointestinal tract and what are final products of this process.

In experimental part of the thesis methanolic thyme extract was exposed to simulation of human digestive system. The gastric environment was simulated by lowering pH, while the intestinal environment was simulated by aerobic batch cultivation of tested extracts with donor's faeces.

After the passage in simulated human digestive system was stated that bioactive compounds of thyme are metabolized mainly in intestinal part, especially in the colon.

Keywords: Thyme, essential oil, thymol, thymoquinone, intestinal mikroflóra.

Obsah

1 Úvod	9
2 Vědecká hypotéza a cíle práce.....	10
3 Literární rešerše.....	11
3.1 Rostliny a jejich sekundární metabolity	11
3.1.1 Obranné mechanismy rostlin	12
3.1.2 Rozdělení sekundárních metabolitů	12
3.1.3 Tymián obecný (Thymus vulgaris).....	13
3.2 Nejvýznamnější sekundární metabolity tymiánu.....	14
3.2.1 Sekundární metabolity tymiánu	14
3.2.2 Thymol	16
3.2.3 Karvakrol.....	16
3.2.4 Thymochinon	17
3.2.5 Další obsahové látky tymiánu.....	18
3.3 Biologické účinky sekundárních metabolitů tymiánu.....	18
3.3.1 Biologická aktivita tymiánové silice	19
3.3.2 Biologická aktivita thymolu a karvakrolu	20
3.3.3 Biologická aktivita dalších obsahových látek tymiánu	22
3.4 Stabilita léčiv v trávicím traktu	23
3.5 Metody chemických analýz	24
3.5.1 Extrakční metody	24
3.5.2 Separační metody.....	24
3.5.3 Detekční metody	25
4 Metodika	26
4.1 Chemikálie.....	26
4.2 Fermentace	28
4.2.1 Fermentační médium.....	28
4.2.2 Redukční roztok.....	28
4.2.3 Fosfátový pufr.....	28
4.2.4 Příprava fermentačních mikrokumavek.....	28
4.2.5 Odběr a příprava vzorků stolice.....	29
4.2.6 Proces fermentace	29
4.3 Model trávicího traktu	26
4.3.1 Příprava metanolového extraktu tymiánu.....	26
4.3.2 Příprava roztoků testovaných látek	27
4.3.3 In vitro model proximálních úseků trávicí soustavy	27

Příprava zásobních roztoků.....	27
4.4 Analýza vzroků	29
5 Výsledky	31
6 Diskuze	38
7 Závěr.....	39
8 Literatura	40
9 Seznam použitých zkratk a symbolů	47
10 Samostatné přílohy	Error! Bookmark not defined.

1 Úvod

V současnosti látky související s metabolismem v rostlinách lze dělit na dvě skupiny. Rozdělujeme tak primární a sekundární metabolity. K primárním metabolitům patří organické sloučeniny, které jsou nezbytné pro život buněk. Řadí se sem např. aminokyseliny, cukry či mastné kyseliny. Další skupinou jsou sekundární metabolity, které nejsou nezbytné pro uskutečnění veškerých životních procesů organismu rostliny, ale prokazují různé biologické funkce, což je důležité. Obvykle tyto vlastnosti jsou spojené s obranou proti patogenům nebo predátorům, interakcí s prostředím, přilákání opylovačů, stimulací růstu a regulací metabolismu. Sekundární metabolity jsou produktem speciálních biochemických drah, které jsou zpravidla regulovány sofistikovanými mechanismy.

Silice (někdy také éterické či esenciální oleje) zařazujeme do skupiny sekundárních metabolitů. Silice jsou komplexní směsi těkavých látek dané rostliny. Zpravidla jsou to lipofilní a bezbarvé sloučeniny, které při pokojové teplotě mají tekutou konzistenci. Sekundární metabolity, tedy i silice, se mohou ukládat v různých částech rostlin, včetně kořenů, listů, květů a plodů. Jejich množství a složení se může lišit v závislosti na části rostliny, věku rostliny a různých fyziologických podmínkách. Spektrum jejich účinků na organismus člověka je velice široké, někdy dokonce málo prozkoumané. Ovšem nejčastějšími jsou antibakteriální, protizánětlivé, antiseptické nebo také antidiuretické vlastnosti.

Sekundární metabolity jsou sloučeniny úzce spojené s lidským životem. Studium jejich metabolismu v lidském těle je důležité z několika důvodů. Za prvé, většina z nich má farmakologické účinky a může být využita při vývoji nových léčiv. Za druhé, silice obsahující tyto sloučeniny jsou důležitou součástí lidské stravy. Je však důležité poznamenat, že nadměrná konzumace sekundárních metabolitů může mít negativní účinky na lidské zdraví. Může vést k otravám, zdravotním rizikům, a dokonce ke vzniku chronických onemocnění. Je proto důležité pečlivě sledovat příjem těchto sloučenin.

Tymián (*Thymus vulgaris*) je aromatická bylina, která se často používá jako koření a léčivá rostlina. Je to stálezelený keř, který roste převážně v teplých a suchých oblastech Evropy a Asie. obsahuje mnoho účinných látek, včetně silic, které jsou přítomny v rostlinných buňkách. Mezi hlavní složky silice v tymiánu patří thymol a karvakrol. Ve vědeckých pracích se uvádí, že se tymián používá v léčitelství pro své protizánětlivé, antibakteriální a expektorantní účinky. Vlastnosti této silice na organismus člověka jsou relativně dobře popsány v literatuře, ovšem pouze malé množství studií se zaměřuje na metabolismus jednotlivých složek této silice v lidském těle.

Předložená diplomová práce je zaměřena na zkoumání metabolismu složek silice *Thymus vulgaris* na modelu trávicího traktu člověka. Výsledky daného experimentu by mohly přispět k lepšímu pochopení účinků silic na lidské zdraví a umožnit vývoj nových terapeutických přístupů.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

2.1 Vědecká hypotéza

Při průchodu trávicím traktem dochází k chemickým změnám složek tymiánového extraktu.

2.2 Cíle práce

Cílem diplomové práce je zjistit, zda jsou hlavní složky tymiánové silice (thymol, thymochinon a jejich deriváty) metabolizovány při průchodu trávicím traktem a případně jaké produkty z těchto látek vznikají. Zaměříme se na simulaci podmínek v žaludku (nízké pH) a v tlustém střevě (mikrobiální působení).

3 Literární rešerše

3.1 Rostliny a jejich sekundární metabolity

Rostliny nejenom produkují základní živiny, ale také mohou syntetizovat mnoho různých látek, které nejsou nezbytné pro přežití, ale mají specifické funkce v rostlině. Základním rozdílem mezi primárním a sekundárním metabolismem u rostlin je, že primární metabolismus zahrnuje procesy nezbytné pro zabezpečení energie a stavebních materiálů, přímo potřebné pro růst rostlin, zatímco sekundární metabolismus produkuje látky, které nejsou životně nezbytné, ale mohou mít různé účinky, včetně účinků na lidský nebo zvířecí organismus. Sekundární metabolity jsou produkty vedlejších metabolických drah, které se vyskytují v menších množstvích a jsou většinou specifické pro určitý druh rostliny.

Sekundární metabolity a mohou se používat jako ochrana před škůdci a patogeny, regulace růstu, lákání opylovačů a mnoho dalších funkcí. Základem tohoto metabolismu jsou anabolické procesy, které vytvářejí látky, a katabolické procesy, které tyto látky rozkládají. Tyto procesy probíhají v buňkách souběžně a ovlivňují se navzájem. Tyto látky jsou syntetizovány pomocí enzymatických reakcí a jsou často ovlivněny vnějšími faktory, jako jsou teplota, světlo a stresové podmínky. Sekundární metabolity jsou velmi různorodé a zahrnují alkaloidy, flavonoidy, glykosidy, terpenoidy, fenolické sloučeniny, těkavé oleje a mnoho dalších.

Sekundární metabolity rostlin jsou skupinou chemických sloučenin, které mají široké využití v potravinářském a kosmetickém průmyslu, kvůli svým léčebným účinkům a antioxidantovým vlastnostem. Tyto látky mohou mít také významné vlivy na lidské zdraví, obsahují farmakologické vlastnosti a jsou využívány jako léčivé látky v lékařství a farmakologii. Produkce sekundárních metabolitů je ovlivňována různými faktory, jako jsou podmínky prostředí, stáří rostlin a stres. Jejich syntéza je pak regulována složitou sítí genů a enzymů (Hadacek 2002; Namdeo 2007; Novák, 2007; Opletal 2016; Erb & Kliebenstein 2020).

Edreva et al. (2008) uvádí, že chemické vlastnosti i interakce sekundárních metabolitů přispívají k jejich obranným funkcím v různých stresových podmínkách, a poskytují tak důkazy o chemických vlastnostech a interakcích sekundárních metabolitů jako o faktorech určujících jejich obranné funkce v různých stresových situacích.

Wink (2015), Vasconsuelo & Boland R. (2007) píšou, že rostliny produkují sekundární metabolity jako obranné sloučeniny proti různým hrozbám a jako signální sloučeniny. Tyto metabolity mají širokou škálu biologických a farmakologických vlastností a lze je využít k léčbě zdravotních poruch nebo nemocí. Sekundární metabolity interagují s různými cíli v buňkách, jako jsou proteiny, biomembrány nebo nukleové kyseliny. Některé metabolity byly optimalizovány tak, aby cílily na specifické molekulární receptory, zatímco jiné cílí na více proteinů vytvářením vazeb, modulací jejich 3D struktury a změnou jejich bioaktivity. Je popsán způsob účinku různých skupin běžných sekundárních metabolitů rostlinného původu a jejich vícecílová aktivita vysvětluje lékařské využití komplexních extraktů z léčivých rostlin u více zdravotních problémů. Fytomedicína není placebo lék, ale racionální lék, a klinické studie prokázaly účinnost řady z nich.

3.1.1 Obranné mechanismy rostlin

Rostliny mají rozsáhlý obranný systém, který se vyrovnává s různými stresy, jako jsou abiotické faktory nebo býložravý hmyz a patogenní mikroorganismy a houby. K reakci na tyto stresy se aktivují různé reakční dráhy a signalizační cesty. Rostliny používají několik mechanismů obrany, včetně vytváření bariér, produkce enzymů ničících buněčnou stěnu patogenů a inhibičních proteinů, které omezují účinek patogenů. Kromě toho mají rostliny jedinečné signalizační a identifikační mechanismy, které jim umožňují rychle identifikovat vstup patogenu a zahájit vhodnou obrannou reakci. Sekundární metabolity jsou vedlejší produkty primárního metabolismu, které mají obrannou funkci (Yang et al. 1997; Osbourn et al. 2003; Pichersky E & Lewinsohn 2011; Erb 2018; Erb & Reymond P 2019; Erb & Kliebenstein 2020).

3.1.2 Rozdělení sekundárních metabolitů

Sekundární metabolity rostlin (SMR) jsou typicky kategorizovány do šesti širokých molekulárních rodin v závislosti na jejich biosyntetických drahách: fenoly, terpeny, steroidy, alkaloidy a flavonoidy. Hlavními kategoriemi sekundárních metabolitů generovaných rostlinami jsou síra/dusík, terpeny a sloučeniny obsahující fenoly.

Mezi nejrozšířenější skupiny sekundárních metabolitů patří alkaloidy, glukosinoláty, fenolické látky a terpenoidy. Alkaloidy jsou metabolity, které obsahují dusík. V rostlinách bylo zaznamenáno asi 10 000 různých alkaloidních sloučenin. Lichman (2021) píše, že na základě biosyntézy je alkaloidy možné rozdělit do tří tříd:

- protoalkaloidy
- pseudoalkaloidy
- pravé alkaloidy

Protoalkaloidy i pravé alkaloidy pocházejí z aminokyselin. Pseudoalkaloidy však nejsou vyrobeny z aminokyselin. Pravé alkaloidy sdílejí heterocyklický kruh s dusíkem a jsou odvozeny od aminokyselin. Protože alkaloidy narušují replikaci DNA, aktivitu enzymů a syntézu proteinů, jsou jedovaté pro býložravce a narušují přenos nervových signálů.

Glukosinoláty jsou jedním z těchto metabolitů, které se nacházejí v rostlinách Brassicaceae a Arabidopsis. Tyto látky obsahují síru a jsou obvykle uloženy ve vakuolách buněk. Poškození rostliny býložravcem způsobí rozpad rostlinných buněk, což vede k uvolnění myrosináz, které přemění glukosinoláty na jedovaté sloučeniny, jako jsou isothiokyanáty, thiokyanáty a nitrily. Tyto látky jsou stejně účinné jako syntetické insekticidy při odrazování býložravého hmyzu (Keith, Mitchell-Olds 2017, Tauchen & Klouček 2020).

Jak uvádí Zhang et al. (2021) téměř 10 000 různých sekundárních metabolitů tvoří různorodou kategorii chemikálií známých jako rostlinné fenoly. Sekundární metabolity s hydroxylovou funkční skupinou (fenylová skupina) připojenou k aromatickému kruhu jsou známé jako fenolické látky. Jsou to nejrozšířenější sekundární metabolity. Jednoduché fenoly (jako jsou katecholy a deriváty kyseliny hydroxybenzoové), ligniny, kondenzované taniny, stilbeny, katecholové melaniny a flavonoidy, to vše jsou příklady fenolických sloučenin. Fenoly jsou různorodou skupinou molekul díky své unikátní chemické struktuře (Sonmezdag et al. 2016). Kromě agresivního odrazování býložravců tyto metabolity také aktivně lákají opylovače k rostlinám. U býložravců mohou fenoly působit jako silné jedy nebo mohou oxidovány

enzymy, jako jsou polyfenoloxidázy nebo peroxidázy, za vzniku toxických sloučenin, které fyziologicky narušují vývoj a růst hmyzu.

Terpeny jsou rozsáhlou a rozmanitou skupinou chemických látek, které se vyskytují v živých organismech, a dosud je známo více než 80 000 sloučenin (Zhou & Pichersky 2020). Vznikají kondenzací izoprenových jednotek a mají charakteristickou strukturu založenou na pětiuhlíkaté izoprenové jednotce (Christianson 2017; Chen et al. 2011). Některé terpeny, jako jsou gibereliny a brassinosteroidy, se podílejí na základních procesech, jako je růst a vývoj rostlin, i když většina terpenů je klíčová pro obranu rostlin. Slouží k různým účelům, jako je prevence kladení vajíček, krmení nebo přímé toxicity. Terpeny mají schopnost přitahovat opylující hmyz (Zhang et al. 2021).

Terpeny lze klasifikovat s vysokým obsahem par jako těkavé, například hemiterpeny, monoterpeny a seskviterpeny. Těkavost terpenů závisí na počtu isoprenových jednotek v jejich struktuře. Hemiterpeny a monoterpeny s jednou, resp. dvěma izoprenovými jednotkami jsou vysoce těkavé a mají silný zápach. Seskviterpeny se třemi isoprenovými jednotkami jsou také těkavé, ale méně než monoterpeny. Diterpeny se čtyřmi isoprenovými jednotkami jsou obvykle netěkavé nebo polotěkavé. Některé terpeny, stejně jako diterpeny, jsou polotěkavé nebo netěkavé a terpeny s menším počtem izoprenových jednotek jsou vysoce těkavé (Dvořáková et al. 2011; Cox-Georgian et al. 2019; Ninkuu et al. 2021).

Monoterpeny jsou rozmanitou skupinou sloučenin, které se vyskytují v široké škále rostlin a organismů. Skládají se ze dvou isoprenoidních jednotek a jsou známé svou výraznou a příjemnou vůní, která přispívá k aroma mnoha květů a plodů. Monoterpeny existují v acyklické, monocyklické a bicyklické formě a jsou základními složkami esenciálních olejů, které dodávají rostlinám chuť a vůni. Mají zásadní význam pro širokou škálu použití v zemědělství, farmacii, kosmetice a potravinářství (Velíšek 2002; Loreto et al. 2002; Ninkuu et al. 2021; Cox-Georgian et al. 2019).

Sekundární metabolity přitahují díky své významné roli ve fyziologii rostlin velkou pozornost. Zvýšením syntézy četných enzymů zapojených do produkce sekundárních metabolitů a zvýšením exprese různých genů zapojených do mechanismů rezistence rostlin zprostředkovávají sekundární metabolity různé obranné funkce. Postupem času rostliny získaly obranné systémy proti různým abiotickým a biotickým stresorům. Otazka je, jestli toto je možno používat při řešení nejakých problem člověka. Tato diplomová práce se zabývá tím, jestli mohou antibakteriální efekt sekundárních metabolitů rostlin mít kladný efekt na travicí system člověka. Konkrétně se práce obrací na léčivou rostlinu Tymián obecný (*Thymus vulgaris*).

3.1.3 Tymián obecný (*Thymus vulgaris*)

Tymián obecný (*Thymus vulgaris*) je aromatickou bylinou z čeledi hluchavkovitých (*Lamiaceae*), jejíž zástupci jsou významnými producenty silic. Pochází od Středomoří po jižní Evropu, ale i v dalších oblastech světa, jako je Asie (Maksimovic et al., 2008; Tauchen & Klouček 2020).

Aromatické polokeře vysoké až 0,40 m (viz obr.1). Ve střední Evropě pěstovány jako jednoleté, dřevnatějící byliny. Stonky přímé, bohatě větvené, na bázi dřevnaté. Listy 5 - 9 mm dlouhé, krátce řapíkaté s čepelí eliptickou až úzce kopinatou, podvinuté, celokrajné, na líci lysé

na rubu běloplstnaté, s četnými žlázkami. Květy jsou fialové, 3 až 7 mm dlouhé a nesou se v rozvětvených hroznech. Kvete od května do září, lichopřesleny tvoří lichoklas, koruna světle fialová, růžová nebo bělavá. Plodem jsou drobné, vejcovité, hnědé tvrdky (Korbelář & Endris 1981; Štěpánek 2000).

Česká jména jsou thymus, vlašská mateřídouška, thym vonný, mateřídouška římská, douška tymián, douška obecná, tymián, mateřídouška obecná.

V České republice se vyskytuje 7 druhů mateřídoušek. Ve volné přírodě je možné se nejčastěji setkat s 2 nejrozšířenějšími druhy: mateřídouška obecná (*Thymus vulgaris*) a mateřídouška vejčitá (*Thymus pulegioides*).

Člověk používá léčivé rostliny odedávna. Mezi ně patří i tymián, jehož terapeutické přednosti byly prokázány mnoha pracemi, zejména v oblasti boje proti infekčním chorobám. Několik druhů tymiánu se pro různé účely používalo již od starověkého Egypta a Řecka. Drogy z tymiánu (*T. herba* a *T. aetheroleum*) jsou zahrnuty v monografiích WHO (1999), European Pharmacopoeia (2015) a také v monografii Evropské unie o bylinkách (2016). Tymián obecný obsahuje silice s hlavními monoterpeny thymolem, p-cymenem a γ -terpinenem, přičemž nejvýznamnějšími fenolickými sloučeninami jsou kyseliny rozmarýnová, kávová a jejich deriváty, které mají také silné antioxidační vlastnosti a mohou přispívat k ochraně buněk před oxidativním stresem (Kim et al. 2022).

Tymián má výraznou aromatickou chuť a je spolu s majoránkou jedním z nejpoužívanějších koření a potravinářských přísad, které se používají k ochucení masa a omáček. Kromě kulinářského využití se tymián tradičně používá jako lidový lék k léčbě různých onemocnění, včetně infekcí dýchacích cest, zažívacích problémů a kožních onemocnění. Tymián je bohatý na silice a další sloučeniny, o nichž se předpokládá, že mají léčivé účinky (Korbelář & Endris 1981; Takeuchi et al. 2004).



Obrázek 1: Tymián obecný (*Thymus vulgaris*) (převzato z Almanea et al. (2019))

3.2 Nejvýznamnější sekundární metabolity tymiánu

3.2.1 Sekundární metabolity tymiánu

Nejdůležitějšími sekundárními metabolity tymiánu jsou p-cymen a jeho fenolové deriváty thymol a karvakrol, které patří do relativně malé skupiny aromatických sloučenin, jež jsou produktem kondenzace isoprenu, nikoli metabolismu vedoucího k aromatickým sloučeninám, prostřednictvím acetátové nebo šikimátové cesty. Tyto sloučeniny obsahují uhlíkový skelet

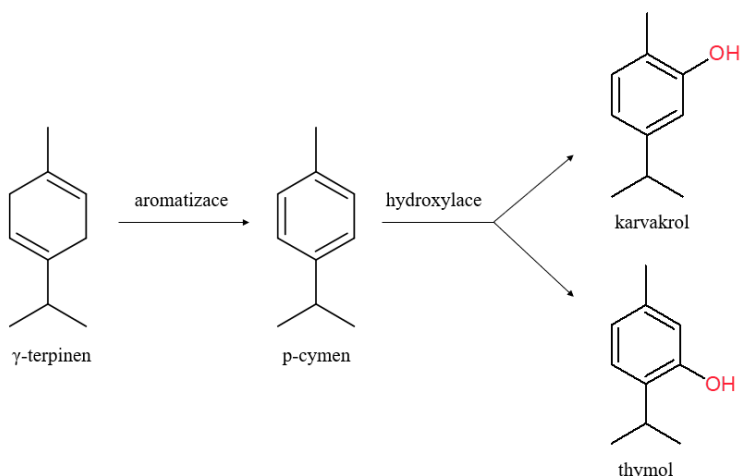
typický pro monocyklické monoterpeny, jejich podobnost s limonenem a oxidovanými monoterpeny, jako je menthon nebo karvon, naznačuje, že tyto sloučeniny prošly podobnými modifikacemi, včetně dehydrogenačních reakcí (Croteau et al. 1985; Tauchen & Klouček 2020). Některé z těchto sloučenin jsou také používány v tradiční medicíně k léčbě různých onemocnění, včetně bolestí hlavy, nachlazení a respiračních potíží.

Tymián je bohatý na flavonoidy a fenolické antioxidanty, jako jsou apigenin, luteolin a thymonin. Obsahuje také saponiny, třísloviny a silice, přičemž saponiny a třísloviny jsou známé svými antimikrobiálními a antioxidačními vlastnostmi. Zasahuje do procesu růstu, ochrany rostlin proti hmyzům škůdcům. Kromě toho přispívají k dodání barvy a chuti specifické pro ovoce a zeleninu. Tymián obsahuje také triterpenoidy, což jsou rostlinné steroidy, které mají různé léčivé a agrochemické účinky, např. protinádorové, antibakteriální, antihelmintické, imunosupresivní, hepatoprotektivní a působí také jako regulátory rostlinného růstu, pohlavní hormony, cytotoxické a kardiotonické agens (Asha & Mathew 2017; Dauqan & Abdullah 2017). V práci Asha & Mathew (2017) byl stanoven profil různých sekundárních metabolitů tymiánu obecného pomocí HPTLC.

Tabulka 1: Předběžný screening sekundárních metabolitů z metanolového extraktu *Thymus vulgaris* L. (listy) (upraveno a převzato z Asha & Mathew (2017)).

No.	Sekundární metabolity	Test	Přítomnost
1	Alkaloidy	Mayerův test	+
2	Fenolické sloučeniny	Chlorid železitý	+
3	Steroidy	Libermann-Burchard test	+
4	Flavonoidy	Shinoda test	+
5	Srdeční glykosidy	Keller Killiani test	-
6	Třísloviny	FeCl ₃ test	+
7	Triterpenoidy	Libermann-Burchard test	+
8	Saponiny	Test napěnění	+

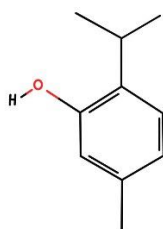
Dráha biosyntézy thymolu a karvakrolu zahrnuje přeměnu γ -terpinu na p-cymen a následnou hydroxylaci p-cymenu za vzniku thymolu a karvakrolu. Biosyntéza těchto sloučenin závisí na druhu rostliny, genetické výbavě a faktorech prostředí. Hrubé schéma hlavní biosyntetické dráhy je uvedeno na obrázku 2.



Obrázek 2: Schematické znázornění klíčových kroků biosyntézy thymolu a karvakrolu (upraveno a převzato z Adam Kowalczyk & Martyna Przychodna (2020)).

3.2.2 Thymol

Thymol (2-isopropyl-5-methylphenol) monoterpen fenolový derivát cymenu s chemickým vzorcem $C_{10}H_{14}O$. Je přírodní sloučenina, která se vyskytuje v rostlinách, jako je *Monarda fistulosa* a *Monarda didyma*, ale nejhojněji je zastoupena v tymiánové silici (Obrázek 3). Díky svým antiseptickým vlastnostem se thymol běžně používá jako hlavní složka moderních komerčních ústních vod a tradičně se aplikuje v bylinné medicíně k léčbě infekcí úst a krku. Thymol se také používá jako zvýrazňovač chuti v různých potravinách a nápojích. Při perorálním podání potkanům se thymol vylučuje ve formě glukuronidových a sulfátových konjugátů, ačkoli dochází také k významné oxidaci jeho methylové a isopropylové skupiny, což vede k derivátům benzylalkoholu a 2-fenylpropanolu a jim odpovídajících karboxylových kyselin. Hydroxylace kruhu je vedlejší reakcí tohoto procesu. Jeho obsah v tymiánu může dosahovat až 50 % (Singletary 2016).



Obrázek 3: Vzorec thymolu

3.2.3 Karvakrol

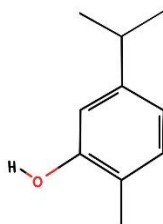
Karvakrol (5-isopropyl-2-methylphenol) znázorněný na obrázku 4, je přirozeně se vyskytující fenolický monoterpenoid s molární hmotností 150,22 g/mol a derivát cymenu.

Jeho chemický vzorec $C_{10}H_{14}O$ a přirozeně se vyskytuje v tymiánu, divokém bergamotu, černém kmínu, oreganu a pepřovníku.

Bod varu karvakrola je 237–238 °C a taje při 1 °C. Není rozpustný ve vodě, ale vysoce rozpustný v organických rozpouštědlech, např. etanol, metanol, éter. Biologické aktivity karvakrolu byly prokázány v různých *in vivo* a *in vitro* studiích, včetně antioxidační, antiseptické, protizánětlivé, antikarcinogenní, antidiabetické role, imunomodulační, antimikrobiální aktivity, antispasmodické, antibakteriální a růstové promotory. Protože se jedná o přírodní derivát cymenu, má silné schopnosti inhibovat bakterie a díky svým aromatickým vlastnostem se používá v potravinářském průmyslu jako konzervační látka (Alagawany et al. 2015; Ares et al. 2020; Churklam et al. 2020; Lee et al. 2020; Tauchen & Klouček 2020; Sun et al. 2020; Imran et al. 2022).

Rostliny syntetizují karvakrol mevalonátovou cestou. Glukóza se nejprve dekarboxyluje a acetyluje na acetylkoenzym, který se pak může přeměnit na kyselinu mevalonovou. Aromatizací se kyselina mevalonová přemění na γ -terpinen, který se pak přemění na p-cymen. Pak následuje hydroxylace p-cymenu za vzniku karvakrolu.

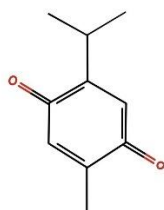
Co se týče katabolismu karvakrolu u potkanů, bylo zjištěno, že alifatické skupiny se významně metabolizují a aromatická hydroxylace na 2,3-dihydroxy-p-cymen je vedlejší cestou, která může vést až k monokarboxylovým kyselinám. Nicméně, není nám známa žádná práce o biotransformaci karvakrolu u lidí (Başer & Buchbauer 2010; Unusan 2020).



Obrázek 4: Vzorec karvakrolu

3.2.4 Thymochinon

Thymochinon (2-isopropyl-5-methyl-1,4-benzochinon) (Obrázek 5) je fytochemická látka se vzorcem $C_{10}H_{12}O_2$, která se nachází především v rostlině *Nigella sativa* (černucha setá), jenž roste ve Středomoří, pěstuje se i v jiných zemích a má dlouhou historii používání v lidovém léčitelství k léčbě různých onemocnění (Edris 2010, Taborsky et al. 2012).



Obrázek 5: Vzorec thymochinonu

3.2.5 Další obsahové látky tymiánu

Mezi další významné obsahové látky tymiánu patří i glykosidy výše zmíněných složek silice (Hanková 2021). Glykosidy jsou sloučeniny sestávající z molekuly cukru spojené s necukernou molekulou zvanou aglykon. Bylo prokázáno, že glykosidy mají potenciální léčebné účinky u několika onemocnění, včetně rakoviny, trombózy, cukrovky, poškození myokardu, oxidačního stresu, virových infekcí, deprese, malárie a plísňových infekcí (Lindhorst 2007; Serafini et al. 2011; Khan H. et al. 2017). Glykosidy jsou rozmanitou skupinou přírodních sloučenin vyskytujících se v rostlinách s širokou škálou biologických aktivit, včetně antimikrobiálních, protinádorových a protizánětlivých vlastností. Důležitou roli v metabolismu a aktivaci rostlinných glykosidů hrají glykosidázy, enzymy katalyzující hydrolýzu glykosidických vazeb. Autoři (Theilmann et al. 2017; Kytidou et al. 2020, 2018) naznačují, že glykosidy mají potenciál být cílovými látkami léčiv a že rostlinné glykosidy by mohly být využity jako hlavní sloučeniny pro vývoj léčiv.

3.3 Biologické účinky sekundárních metabolitů tymiánu

Některé biologické aktivity přímo souvisejí s jejím chemickým složením, které může být ovlivněno vegetační fází, sezónními výkyvy vlhkosti, teploty, sklizní a posklizňovými faktory (sušení a skladování) (Diniz do Nascimento et al. 2020).

Tymián obecný (*Thymus vulgaris*) je rostlina s různými léčivými vlastnostmi, jako jsou protikřečové, antiseptické, expektorační, karminativní a antioxidační účinky. Jeho izolované alkaloidy a syntetické deriváty jsou široce využívány pro své analgetické, protikřečové a baktericidní vlastnosti. Používá se jako antiseptikum, aromatická přísada do potravin a nápojů, v aromaterapii, osvěžovače dechu, lékařské dezinfekční prostředky a další (Maksimovic et al. 2008; Başer & Buchbauer 2010; Tauchen & Klouček 2020; Sabah 2021).

Thymol a karvakrol mohou díky svému hydrofobnímu složení snadno pronikat lipidovými bariérami buněčných membrán, které jsou jejich cílem. Destabilizují lipidovou vrstvu buněčné membrány a způsobují významné změny v její struktuře, což vede ke zvýšené propustnosti pro draselné a vodíkové ionty. Ovlivňují také aktivitu vnitřních membránových proteinů, což vede ke změnám jejich konformace a aktivity. Tento proces může vést k napětí a destabilizaci buněčné membrány. Kromě toho, mají široké spektrum biologických a terapeutických účinků, včetně antibiofilmového působení proti různým bakteriím, antimykotických vlastností proti rezistentním kmenům a antivirové aktivity proti několika

virům, včetně Sars-CoV-2 (Adam Kowalczyk & Martyna Przychodna 2020; Sylwia Sopata 2020; Yan et al. 2023).

Thymol a karvakrol mají strukturální podobu, liší se pouze polohou hydroxylové skupiny na fenolovém jádře. Bylo prokázáno synergické působení těchto dvou látek proti *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aureginosa* (Lambert et al. 2001). U gramnegativních bakterií dezintegrují vnější membránu uvolňováním lipopolysacharidů a zvyšováním propustnosti cytoplazmatické membrány pro adenosintrifosfát. Thymol se používá též jako insekticid proti různým druhům hmyzu, včetně komárů, působí jako inhibitory proteinů vázajících pachové látky (Nerio et al. 2010; Bento et al. 2013; Diniz do Nascimento et al. 2020).

Byly prokázány též inhibičními účinky thymolu a příbuzných chinonů na biosyntézu prostaglandinu E₂ (PGE₂), který je mediátorem zánětu a bolesti. Autoři provedli experimenty s použitím *in vitro* modelů cyklooxygenázy-1 (COX-1) a cyklooxygenázy-2 (COX-2), enzymů podílejících se na biosyntéze prostaglandinu E₂ (PGE₂). Výsledky ukázaly, že thymol i chinony vykazují významné inhibiční účinky na biosyntézu PGE₂ katalyzovanou COX-1 a COX-2, přičemž chinony jsou silnějšími inhibitory než thymol. Tato zjištění naznačují, že tyto látky mohou mít potenciál jako přírodní protizánětlivé látky a mohly by být užitečnou alternativou syntetických léčiv s možnými vedlejšími účinky (Maršík et al. 2005; Harzallah et al. 2011).

3.3.1 Biologická aktivita tymiánové silice

Tymiánové silice obsahují bioaktivní monoterpeny, jako jsou thymol, karvakrol a linalool, a mají řadu terapeutických účinků, včetně antirevmatických, antiseptických, protikřečových, antioxidačních, protizánětlivých, antimikrobiálních, srdečních, karminativních, diuretických a expektoračních. Thymol je hlavní složkou *T. algeriensis*, *T. vulgaris* a *T. serpyllum*, přičemž *T. algeriensis* je nejrozšířenější. Jsou diskutovány některé potenciální zdravotní účinky silice *Thymus vulgaris* na gastrointestinální trakt (Skočibušić et al. 2006; Nikolić et al. 2014; Semeniuc et al. 2017; Asha & Mathew 2017; Dauqan & Abdullah 2017; Almanea et al. 2019).

Silice mají antimikrobiální a imunomodulační vlastnosti, díky nimž jsou užitečné pro konzervaci potravin, jako alternativa antibiotik a jako funkční složky potravin. Některé silice jsou účinné proti různým kmenům, ale jejich účinnost nelze zobecnit. Mají také vysoký obsah fenolických látek, což jim propůjčuje antioxidační vlastnosti. Silice vykazují pozoruhodnou antioxidační aktivitu v dávkách mezi 0,01 a 10 mg/ml díky svému bohatství na fenolické deriváty. Jsou účinnější proti patogenním bakteriím než proti komenzálním bakteriím, což naznačuje, že by mohly být selektivně použity k potlačení škodlivých mikroorganismů, aniž by narušily prospěšnou střevní mikroflóru (Thapa et al. 2012; Valdivieso-Ugarte et al. 2019).

K fyzikálním faktorům ovlivňujícím aktivitu silic patří pH, teplota, hladina kyslíku. Nižší pH, teplota, koncentrace kyslíku a přítomnost chelátů zvyšují jejich účinnost. Silice obsahují velké množství látek a je pravděpodobné, že jejich antibakteriální vlastnosti jsou podmíněny několika různými mechanismy – rozkladem buněčné stěny, narušením transportu skrz membrány nebo koagulací obsahu buňky. Určité složky působí tzv. synergicky – navzájem zvyšují svoji aktivitu. Podle Gill et al. (2002), mají silice zpravidla větší účinek než izolované složky nebo jejich kombinace. Je pravděpodobně, že i minoritní složky mají vliv na

antimikrobiální aktivitu a působí synergicky navzájem. Kromě toho, silice mohou posilovat účinek prostředků konvenčně používaných k dezinfekci potravin.

Hydrofobní povaha složek silic jim umožňuje zabudovávat se do membrán a tím měnit jejich permeabilitu, což následně vede k uvolnění buněčného obsahu. Tímto způsobem působí například thymol a karvakrol (Lambert et al. 2001). Grampozitivní bakterie jsou citlivější k působení silic vzhledem k jednodušší struktuře buněčné stěny (Nazzaro et al. 2013).

Podle Cosentino et al. (1999) antibakteriální aktivitu podmiňují zejména fenolické složky. Nejúčinnější proti alimentárním patogenům jsou silice s vysokým obsahem fenolických sloučenin jako thymol, karvakrol nebo eugenol (Cosentino et al. 1999; Lambert et al. 2001; Semeniuc et al. 2017). Screening látek na antimikrobiální aktivitu se může provádět podobně jako u antibiotik, např. diskovou difuzní nebo dilučními metodami. Princip této metody spočívá v nanesení kapek testované látky na agarovou půdu. Pokud je bakterie citlivá, vytváří kolem ní inhibiční zónu.

Tymiánová silice má potenciální přínosy při léčbě gastrointestinálních poruch, jako jsou syndrom dráždivého tračníku, zánětlivé onemocnění střev a žaludeční vředy. Protože mají protizánětlivé, antimikrobiální a antioxidační vlastnosti a ohou modulovat střevní mikroflóru, snižovat zánět a podporovat hojení tkání, a také modulovat reakce, při kterých vznikají reaktivní formy kyslíku (Markesbery 1997; Farah et al. 2009; Kruk et al. 2000; Spisni et al. 2020; Tanveer et al. 2020).

Nieto (2020) píše, že tymián zvyšuje stabilitu a snižuje oxidaci lipidů v různých potravinách během skladování. Navzdory těmto výhodám je použití tymiánových extraktů nebo tymiánové silice jako přírodních potravinářských aditiv ve srovnání s jinými přírodními konzervanty omezené. A podává přehled příznivých účinků bioaktivních látek tymiánu a jeho možného využití jako přírodního konzervantu potravin s přihlédnutím k jeho původu z rostlin, rostlinných extraktů nebo silice (Burt 2004).

3.3.2 Biologická aktivita thymolu a karvakrolu

Rathod et al (2021) identifikovali několik výhod těchto látek, včetně zlepšení kvality a bezpečnosti potravin a celkového pozitivního dopadu na lidské zdraví. Karapinar & Esen Aktuğ (1987) ve své studii testovali čtyři druhy složek silic z koření - thymol, eugenol, mentol a anetol - na jejich antibakteriální aktivitu vůči třem typům bakterií (*Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* a *Vibrio parahaemolyticus*). Zjistili, že eugenol byl nejúčinnější proti všem třem typům bakterií, následoval thymol, mentol a anetol. U těchto složek byly prokázány různé účinky, včetně antimikrobiálních, antimykotických, antiseptických a protizánětlivých. Bylo také zjištěno, že inhibují růst některých bakterií přenášených potravinami, jako je *Staphylococcus aureus*.

Karvakrol a thymol jsou sekundárními metabolity, které vykazují široké spektrum nutričních, funkčních a biologických aktivit, a tak jsou důležitými složkami nutraceutické stravy (Rathod et al. 2021).

3.3.2.1 Antimikrobiální účinky thymolu a karvakrolu

Engel et al. (2017) dochází k závěru, že tyto sloučeniny mohou být účinné proti *S. aureus* a *S. enterica*, a také bránit tvorbě biofilmu. Mikroenkapsulovaný karvakrol prokázal

antimikrobiální aktivitu proti několika patogenům, včetně *Salmonella typhi* (68,0 %), a *Listeria monocytogenes* (89,0 %) (Fonseca a kol. 2019).

Imran et al. (2022) a Boruğā et al (2014) uvádějí, že synergické účinky karvakrolu a thymolu jsou také významné, zejména při boji s bakteriemi, jako jsou *E. coli*, *L. monocytogenes* a *S. aureus*. Kombinace karvakrolu s jinými látkami, jako je hydroxypropylmethylcelulóza, tapiokový škrob, glycerol a sorbát draselný, vykazovala také významné antimikrobiální účinky na *Zygosaccharomyces bailii*, *Pseudomonas fluorescens* a *Lactobacillus plantarum* (Rúa et al. 2019). Karvakrol byl také prokázán jako 10krát účinnější než jiné sekundární metabolity tymiánu díky přítomnosti volné hydroxylové skupiny, hydrofobnosti a fenolické části (Jukic et al. 2007; Sharifi-Rad et al. 2018). Tyto výsledky ukazují, že karvakrol a thymol jsou důležité látky, které mohou být použity jako antimikrobiální činidla v potravinářství a lékařství.

Na základě těchto výsledků lze tedy říci, že potvrzují potenciální využití sekundárních metabolitů tymiánu v potravinářském průmyslu k ochraně potravin před bakteriemi a prodloužení jejich trvanlivosti (Rota et al. 2008).

3.3.2.2 Antioxidační účinky thymolu a karvakrolu

Jak uvádí Imran et.al. (2022), karvakrol chrání před oxidačním stresem způsobeným omezovacím stresem poškozuje mozek, játra a ledviny. V játrech vede akutní pankreatitida k multiorgánové dysfunkci a bylo zjištěno, že karvakrol má antioxidační a hepatoprotektivní vlastnosti.

Bylo zjištěno, že tyto přírodní sloučeniny vyvolávají oxidační stres při vyšších koncentracích, což ukazuje na důležitost úpravy jejich koncentrace pro použití jako antioxidantů. Karvakrol, thymol a jejich směs v poměru 10:1 dokázaly působit proti vyvolanému oxidačnímu stresu. To bylo způsobeno scavengingovou schopností karvakrolu eliminovat volné radikály a bylo zjištěno, že účinnost této aktivity souvisí s jeho koncentrací. Rathod et al (2021).

Ezz-Eldin a kol. (2020) prokázali antioxidační a protizánětlivé vlastnosti karvakrolu, které pomáhají tlumit bolesti a léčit bronchiální astma.

Autoři Grigore et al. (2010) zjistili, že hlavním faktorem antioxidační aktivity silice je thymol. Po analýze chemického složení a antioxidační aktivity sekundárních metabolitů tymiánu dvěma různými metodami dospěli k závěru, že mají silnou antioxidační aktivitu získanou hydrodestilací, ve srovnání s olejem získaným parní destilací je mnohem vyšší.

3.3.2.3 Antivirové účinky thymolu a karvakrolu

Virová onemocnění zůstávají celosvětově hlavním zdravotním problémem a úzké mechanismy účinku antivirotik často vedou k rezistenci virů. Naproti tomu sekundární metabolity tymiánu mají díky svému komplexnímu složení a synergickým bioaktivním sloučeninám všestranné mechanismy účinku. Na rozdíl od syntetických antivirotik, která působí na specifické typy virů, mohou silice působit na extracelulární úrovni tím, že narušují strukturu virového obalu nebo blokuji virové proteiny potřebné pro vstup do hostitelských buněk (Adam Kowalczyk & Martyna Przychodna 2020; Sylwia Sopata 2020).

Karvakrol také prokázal antivirové a antibiofilmové působení proti uropatogenní *E. coli* (Xu et al. 2008). Tato sloučenina dokázala také inhibovat i růst virů, jako je lidský rotavirus

(RV), zejména virus herpes simplex typu 1 (ACVRHHV-1) odolný vůči acykloviru (Sharifi et al. 2017), lidský respirační syncyziální virus (HRSV) (Pilau et al. 2011) a pandemický virus H₁N₁ dokumentovaný různými vědeckými výzkumy (Mediouni et al. 2020). Byl také studován potenciál karvakrolu pro prevenci rakoviny (Fan et al. 2015; Khan et al. 2023). Kromě toho se ukázalo, že ve studii in vitro karvakrol byl více účinnější než thymol (Sampaio et al. 2021). Zároveň karvakrol ve studiích prokazoval antidiabecké vlastnosti (Cicalău et al. 2021), zlepšoval hojení ran (Costa et al. 2019) a prováděny imunomodulační testy in vivo a in vitro (Jamali et al. 2020).

3.3.2.4 Protirakovinné účinky thymolu a karvakrolu

Karvakrol je přítomen jako silice v aromatických rostlinách a je dobře známý pro své četné biologické aktivity. Terapeutické vlastnosti karvakrolu byly prokázány jako antioxidantní, protirakovinné, prevence diabetu, kardioprotektivní, antiobezitní, hepatoprotektivní a reprodukční funkce, antiaging, antimikrobiální a imunomodulační vlastnosti.

Existují studie, které tvrdí, že karvakrol má protirakovinné účinky. Alvarenga et al. (2016) uvádí, že karvakrol má ochranné účinky při snižování vedlejších účinků chemoterapeutik. Karvakrol redukoval zánětlivé biomarkery. Působí také jako agonista kationtového kanálu přechodného receptorového potenciálu. Karvakrol má protirakovinný účinek proti maligním buňkám prostřednictvím snížení exprese matrix metaloproteázy 2 a 9, indukce apoptózy, zvýšení exprese proapoptotických proteinů, narušení mitochondriální membrány, potlačení signálu kinázy 1/2 mitogenem aktivované proteinkinázy aktivované extracelulárním signálem transdukci a také snížení fosfoinositid 3-kinázy/proteinkinázy B. Snížilo také koncentrace alaninaminotransferázy, alkalické fosfatázy a aspartátaminotransferázy a gama-glutamyltranspeptidázy a také obnovilo funkci jater, hladinu inzulínu a hladinu glukózy v plazmě. Bylo také zjištěno, že karvakrol vykazuje antimikrobiální aktivitu proti *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, koaguláza-negativním stafylokokům, *Salmonella spp.*, *Enterococcus sp.* *Shigella* a *Escherichia coli* (Pol & Smid 1999; Ashraf S. 2017; Kai et al. 2015).

Vědci a výzkumníci studovali potenciál karvakrolu pro prevenci rakoviny, diabetu, hojení ran a prováděly imunomodulační testy in vivo a in vitro. Karvakrol vykazuje vysoký potenciál pro vývoj nových terapeutických alternativ k léčbě lidských nemocí. K objasnění potenciálního terapeutického účinku karvakrolu na molekulární úrovni jsou však stále zapotřebí rozsáhlé studie, a to prostřednictvím dlouhodobé studie účinnosti u člověka se zvláštním zřetelem na jeho letální dávku a toxicitu.

3.3.3 Biologická aktivita dalších obsahových látek tymiánu

Thymochinon je jeden z důležitých derivátů 1,4-benzochinonu a spojován s mnoha důležitými zdravotními účinky u lidí, jako jsou protizánětlivé a protirakovinné vlastnosti a může modulovat hladiny zánětlivých mediátorů v těle. V tymiánové silici tvoří pouze minoritní složku. V kombinaci s klinicky používanými protinádorovými léky thymochinon zlepšuje jejich terapeutický index a zároveň chrání nenádorové tkáně před poškozením způsobeným chemoterapií (Gali-Muhtasib et al. 2006; Tekeoglu et al. 2006; Liu et al. 2022).

Autoři (Ramadan MF. 2007; Halamova et al. 2010) zjistili, že chinony ze semen černuchy seté působí proti kvasinkám, které kazí mléčné výrobky při různých úrovních kyselosti. Studie zjistila, že thymohydrochinon a thymochinon, dva chinony obsažené v semenech černuchy, vykazují silnou antimykotickou aktivitu proti kvasinkám. Protiplísňový účinek byl výraznější při nižších hodnotách pH, což naznačuje, že kombinace těchto chinonů s bakteriemi mléčného kvašení běžně používanými v mléčných výrobcích by mohla být účinným způsobem, jak zabránit kažení. Tato zjištění naznačují potenciální využití chinonů ze semen černuchy při vývoji přírodních konzervačních látek pro mléčné výrobky.

Řada studií ukázala, že při snižování cytokinové bouře a zlepšování výsledků sepse díky nápravě funkce endotelu prostřednictvím inhibice oxidačního stresu a normalizace angiotenzinového systému. Jeho potenciální přínos u kardiovaskulárních onemocnění je založen na jeho schopnosti aktivovat endotelové buňky k produkci oxidu dusnatého a hyperpolarizačního faktoru odvozeného od endotelu, přičemž snižuje tvorbu vazokonstrikčních faktorů, jako je tromboxan, a snižuje oxidační stres v buňkách hladkého svalstva cév. V tomto ohledu může mít potenciál v prevenci kardiovaskulárních komplikací COVID-19 (Idris-Khodja 2012; Alkharfy et al. 2018; Ahmad et al. 2021).

Venkataraman et al. (2021) tvrdí, že thymochinon nebo jeho analogy mohou mít potenciál jako kandidát na léčivo pro léčbu kolitidy.

Thymohydrochinon je aktivní složka především silice ze semen *Nigella sativa*, v tymiánu je zastoupen podobně jako thymochinon pouze minoritně. Má výrazné protizánětlivé účinky. Obě tyto látky jsou také studovány pro své možné protirakovinné účinky a pro vliv na imunitní systém (Ivankovic et al 2006; Gali-Muhtasib et al. 2006b; Halamova et al. 2010; Woo et al. 2012).

3.4 Stabilita léčiv v trávicím traktu

Stabilitu léčiva lze definovat jako časové období během kterého za určitých podmínek sloučenina uchová v původních mezích veškeré vlastnosti (Ahmad et al. 2016). Stabilita je důležitou vlastností pro léčivo, jelikož nestabilní látky mohou vést k nepravdivým výsledkům u biologických testů. Kromě toho, že budou vykazovat nízkou perorální biologickou aktivitu, existuje pravděpodobnost, že dojde k toxickým reakcím v organismu, způsobenými produkty rozkladů. V současné době se stabilita zkoumá různými metodami. Jednou z těchto metod je studium stability v tekutinách gastrointestinálního traktu. Je to důležité zejména pro léčiva, která se podávají *per os* (Di & Kerns 2009).

Podání léčiv perorálně je nejpohodlnější, nejpraktičtější a nejpreferovanější cestou. Avšak často dochází k omezení. První problém vzniká při absorpci molekuly přes stěny gastrointestinálního traktu. Kolem 90 % absorpce léčiv probíhá právě v tenkém střevě. Je nutné, aby molekula prošla střevní bariérou, než bude distribuována do zamýšleného cílového místa pro vyvolání terapeutického účinku. Právě průchodnost látek přes střevní epitel je jedním ze zlomových faktorů, které určují farmakokinetický profil léčiva. Uvádí se také, že dalším významným faktorem je schopnost látky se rozpouštět ve vodě. Vysoká rozpustnost však sama o sobě bude nedostačující k zajištění požadované biodostupnosti a k vyvolání potřebných farmakologických účinků (Azman et al. 2022). Veškeré látky, podávané perorálně mohou podléhat metabolismu. K hlavním přeměnám dochází buď ve střevě nebo v játrech. Často může

dojít k destrukci látky před tím, než se sloučenina dostane krevního oběhu. Dále, játra metabolizují mnoho léčiv, a proto průchod léčiv játry značně snižuje jejich biologickou dostupnost (Mannan & Unnisa 2019).

Perorálně podávané léky v organismu procházejí přes gastrointestinální trakt (GIT). Stabilita v GIT je ovlivněna mimo jiné i hodnotou pH, jelikož je známo, že různé části mají traktu svoji určitou hladinu pH. Stabilitu látek procházených gastrointestinálním traktem mohou ovlivnit i trávicí enzymy, lokalizované se v různých částech GIT a mající schopnost modifikovat látku. Léčivé sloučeniny přes různé části GIT procházejí určitou dobu. Např. v žaludku mohou se nacházet od 60 minut do 5 hodin. Posléze putují do tenkého střeva, kde se mohou nacházet 3 až 8 hodin. Poslední lokalizace je v tlustém střevě, kde doba může dosáhnout až 72 hodiny. Celkově tato cesta může trvat až 85 hodin (Dvořáčková et al. 2013).

Lidský trávicí trakt obsahuje složitý ekosystém symbiotických mikroorganismů, přičemž střevní mikroflóra sídlí zejména v tlustém střevě a hraje důležitou roli v řadě fyziologických a biochemických funkcí. Vyvážená a rozmanitá střevní mikrobiota je považována za důležitý ukazatel lidského zdraví a změny v jejím složení a funkci jsou spojovány s několika zdravotními problémy (Adams M & Moss 2008; Clemente et al. 2012; Bäckhed et al. 2012; Cao et al. 2020).

3.5 Metody chemických analýz

3.5.1 Extrakční metody

Silice se vyrábí pomocí destilaci vodní parou, extrakcí kapalina-kapalina a superkritickou fluidní extrakci (SFE). Pro komerční produkci silic se zpravidla využívá destilace vodní parou. Pomocí SFE je možné dosáhnout přirozenějšího organoleptického složení, ale daná metoda je mnohem nákladnější. Rozdíly ve složení silic extrahovaných různými způsoby mají vliv na jejich účinnost. Například, silice extrahované hexanem mají výraznější antimikrobiální aktivitu v porovnání se silicemi extrahovanými vodní parou (Packiyasothy & Kyle 2002). Vzhledem ke svým fyzikálně-chemickým vlastnostem mají být silice skladovány v těsně uzavřených neprůhledných nádobách, aby nedocházelo k jejich oxidaci.

3.5.2 Separační metody

Separaci je nazýván proces, během kterého se analyt dělí a takto vznikají alespoň dva podíly s různým složením. Pro analytickou chemii má tento proces nepostradatelný vliv. Separace je možné charakterizovat z hlediska selektivity. Látky lze separovat na základě jejich fyzikálních (těkavost, rozpustnost, hustota, velikost částic, barevnost atd.) nebo chemických (reaktivita, kyselost a zásaditost, komplexnost, magnetické vlastnosti atd.) vlastností. Sloučeniny, u kterých jsou rozdíly v těchto charakteristikách minimální, lze rozdělit pokročilejšími metodami (v chromatografii např. dělení optických izomerů prostřednictvím chirálních stacionárních fází).

V analytické chemii je možné rozdělovat separační metody podle typu fáze, mezi které se dané složky směsi distribuují (plyn–kapalina, plyn–pevná látka, kapalina–kapalina, kapalina–pevná látka). Mezi tyto metody patří chromatografie, extrakce, destilace, sublimace,

zonální tavení, využití molekulových sítí atd. Pak se často používá membránové oddělení látek jsou základem pro dialýzu, ultrafiltraci nebo obrácenou osmózu. Nebo prostřednictvím eklektického pole (elektroforéza, hmotnostní spektrometrie, termodifuze).

Chromatografie je separační metoda používaná k oddělení a analýze složek směsi na základě jejich fyzikálních a chemických vlastností. Základní princip zahrnuje použití stacionární fáze a mobilní fáze. Vzorek se přivádí ke stacionární fázi, která může být pevná nebo kapalná, a poté mobilní fáze, obvykle kapalina nebo plyn, prochází stacionární fází. Různé složky směsi interagují se stacionární a mobilní fází různě, což způsobuje jejich vzájemné oddělení. Oddělené složky lze poté analyzovat nebo shromažďovat pro další použití. Obvykle se dělí na dvě hlavní kategorie: plynovou a kapalinovou chromatografii.

Plynová chromatografie (GC) je metoda separace založená na rozdílné rozpustnosti složek směsi v plynové fázi a na rychlosti jejich pohybu přes pevnou fázi, která je uložena v koloně. Při plynové chromatografii se jako nosič plynové fáze používají nosný plyn.

Kapalinová chromatografie (HPLC) je metoda separace založená na rozdílné rozpustnosti složek směsi v kapalně fázi, která protéká pevnou fází (kolonou). V kapalinové chromatografii se jako mobilní fáze používá kapalina, obvykle voda nebo organická rozpouštědla, a jako pevná fáze se používají sorbenty nebo stacionární fáze různého typu. Tyto sorbenty mají specifické vlastnosti, které umožňují oddělit různé složky směsi.

3.5.3 Detekční metody

Detekční metody jsou v analytické chemii důležité pro identifikaci a kvantifikaci chemických sloučenin v různých vzorcích. Mezi ně patří například hmotnostní spektrometrie, absorpční spektroskopie a nukleární magnetická rezonance.

Hmotnostní spektrometrie (MS) je analytická technika používaná k identifikaci a kvantifikaci chemických sloučenin na základě jejich hmotnosti a fragmentace. V této technice se ionizované molekuly analytu rozpadají na fragmenty a tyto fragmenty jsou následně analyzovány za pomoci hmotnostního spektrometru. MS umožňuje detekovat a identifikovat různé typy molekul, včetně organických sloučenin, peptidů, bílkovin a nukleových kyselin. Hmotnostní spektrometrie rozlišuje ionty na základě jejich poměru mezi hmotností a nábojem (m/z).

Absorpční spektroskopie je metoda, která měří absorpci elektromagnetického záření při průchodu látkou. Tento proces umožňuje identifikovat a kvantifikovat specifické chemické sloučeniny v různých vzorcích. Mezi příklady této metody patří UV-VIS spektroskopie, infračervená spektroskopie a Ramanova spektroskopie.

FID (Flame Ionization Detection) je detekční metoda používaná v plynové chromatografii, která detekuje organické sloučeniny, které vytvářejí ionty při spalování v plamenu. Tato metoda se používá zejména k analýze uhlovodíků v různých vzorcích, např. v potravinách, vodě a vzduchu (Klouda 2003).

4 Metodika

Praktická část diplomové práce byla založena na kvalitativním stanovení změn složek metanolového extraktu tymiánu a jeho nejvýznamnějších obsahových látek s biologickou aktivitou thymolu, karvakrolu, thymochinonu a thymohydrochinonu a z polárních metabolitů i komerčně dostupného glykosidu zatarosidu (β -glukosid thymohydrochinonu), jež byly testovány v simulovaném prostředí žaludku a tlustého střeva. Prostor odpovídající žaludku bylo simulované snížením pH, zatímco působení mikrobiomu tlustého střeva bylo zkoumáno pomocí vsádkové anaerobní kultivace testovaných extraktů spolu se stolicí dárce. Takto získané vzorky byly purifikovány precipitací v metanolu v chladu a pH bylo upraveno na cca 7.

Obsah výchozích látek a případných metabolitů byl zjišťován pomocí GC/FID za pomoci příslušných standardů (těžké terpenoidy) a LC-Q-TOF/MS (zatarosid).

4.1 Chemikálie

NH_4HCO_3 (hydrogenuhličitan amonný), NaHCO_3 (hydrogenuhličitan sodný), Na_2HPO_4 (hydrogenfosforečnan sodný), KH_2PO_4 (dihydrogenfosforečnan draselný), MgSO_4 (síran hořečnatý), CaCl_2 (chlorid vápenatý), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (tetrahydrát chloridu manganatého), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (hexahydrát chloridu kobaltnatého), FeCl_3 (chlorid železitý), hemin, trypton, glukóza, maltóza, vitamin K_1 , kvasnicový extrakt, 1M NaOH (hydroxid sodný), resazurin, $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (nonahydrát síranu sodného), 6M HCl (kyselina chlorovodíková), cystein hydrochlorid, plynný dusík, dimethylsulfoxid (DMSO), azid sodný (NaN_3), zásobní roztok thymolu (Thermo Scientific, Germany), zatarosidu (Sigma-Aldrich, Německo), thymochinonu (Sigma-Aldrich, Německo), thymohydrochinonu (v laboratoři rostlinných biotechnologií ÚEB, čistota ověřena pomocí GC/MS) a karvakrolu (FCC, Koscher).

4.2 Model proximální části trávicího traktu

4.2.1 Příprava metanolového extraktu tymiánu

Sušené vzorky tymiánu (*Thymus vulgaris*) (Hanka Mochov s.r.o., ČR) byly použity tak, že byly odděleny listy od stonků. Bylo naváženo 1,1 g sušených listů tymiánu, které byly extrahovány ve dvou postupných extrakcích: 1. na 4 hod a 2. na 20 hod. Vzorek byl nejprve homogenizován v 15 ml 100 % metanolu a po 4 hodinách třepání (100 otáček za minutu) pomocí třepačky (GFL 3006, Německo) a následně odstředěn (9000 ot./min., 10 min.) pomocí centrifugy Universal 320R (Hettich, Německo). Supernatant byl dále skladován při $-18\text{ }^\circ\text{C}$. Zbýlý vzorek po odebrání supernatantu byl opakovaně extrahován pomocí 15 ml 100 % metanolu za stálého třepání, ovšem tentokrát po dobu 20 hod. Druhý supernatant byl přidán ve prvnímu extraktu a objem byl doplněn na 40 ml 100 % metanolem. K úpravě vzorku byla rovněž použita vakuová odparka, která nastavena na teplotu $37\text{ }^\circ\text{C}$ (Buchi Rotavapor R-100, UK). Byla stanovena jeho suchá hmotnost (5,125 mg/ml). Vzorek byl skladován v mrazáku při teplotě $-18\text{ }^\circ\text{C}$. Pro model trávicího traktu bylo odebráno 19 mg suchého extraktu a rozpuštěno v 1 ml 50 % etanolu. Poté bylo odebráno 100 μl resuspendovaného extraktu a přidáno k nim 900 μl destilované vody, což znamená, že vzorek byl 10x ředěn.

4.2.2 Příprava roztoků testovaných látek

Každá látka byla zvážena (1 mg) a umístěna do skleněné vialky (1,5 ml). Do vialky byl přidán 1 ml 50 % metanolu a směs byla za intenzivního míchání na vortexu (Phoenix Instrument, Německo) promíchána. Poté bylo odebráno 100 μ l resuspendované rozpuštěné látky a přidáno 900 μ l metanolu. Výsledek bylo desetinásobné zředění vzorku.

Zásobní roztok o koncentraci 10 mg/ml byl připraven rozpuštěním každé látky v DMSO (dimethylsulfoxid). Pracovní roztok byl vytvořen v den experimentu rozpuštěním 500 μ l zásobního roztoku každé z testovaných látek v 2ml fermentačního média. Koncentrace každé z testovaných látek v pracovním roztoku odpovídala 2 mg/ml.

4.2.3 In vitro model proximálních úseků trávicí soustavy

Byly využity in vitro modely proximálních úseků trávicí soustavy, sestávající z dvou částí, které napodobovaly složení trávicích tekutin v lidském organismu. První část modelu obsahovala roztok imitující složení elektrolytů v ústní dutině (SSF), zatímco druhá část obsahovala roztok napodobující složení trávicích šťáv v žaludku (SGF). Příprava zásobních roztoků Cílem tohoto postupu je simulovat trávení v kontrolovaném prostředí a získat konzistentní výsledky. Chemické složení roztoků a koncentrace jednotlivých složek použitých k přípravě zásobních roztoků SSF, SGF byly převzaty z publikovaného zdroje Minekus et al. (2014) (viz tab.2).

Testované látky byly nejprve připraveny zředěním 96 % etanolem a následně desetinásobným ředěním. Poté byly připraveny zásobní roztoky rozpuštěním složek v destilované vodě, promíchány za použití teflonového magnetického míchadla (1140 ot./min., 10 min.) (IKA® RCT basic, Německo) a přeneseny do vodní lázně o teplotě 37 °C. Pak byly připraveny zásobní roztoky SSF a SGF. V roztoku SSF bylo pH upraveno na hodnotu 7 přidáním HCl. Poté byly připraveny vzorky pro orální fázi smícháním ve 4 ml vialce 500 μ l zásobního roztoku SSF pufru, 12,5 μ l testované látky, 75 μ l amylázy U/ml a doplněny 412,5 μ l vody na 1 ml a důkladně promíchány. Každý vzorek byl připraven ve třech opakováních a negativní kontrolní vzorek byl doplněn etanolem bez testované látky/extraktu. Po inkubaci orální fáze při 37 °C v lázni 2 min byl ke vzorku přidán 1 ml zásobního roztoku SGF pro gastrickou fázi testu, hodnota pH byla upravena na 3 přidáním HCl a vzorek promíchán a inkubován 2 hod při 37 °C v inkubátoru. Pak bylo ke vzorku přidáno 1,5 ml dichlormethanu (DCM, Penta), extrahován za intenzivního míchání na vortexové míchačce při teplotě 25 °C a DCM fáze přenesena do nové 1,5 ml vialky. Získaný extrakt byl uložen do mrazničky pro další zpracování.

Tabulka 2: Příprava zásobních roztoků simulovaných trávicích tekutin. (převzato z Minekus et al. (2014).

		SSF		SGF		SIF	
		pH 7		pH 3		pH 7	
Složka	Koncenrace zásobního roztoku	Objem roztoku*	Konc. v SSF	Objem roztoku*	Konc. v SGF	Objem roztoku*	Konc. v SIF
g l ⁻¹ mol l ⁻¹		ml	mmol l ⁻¹	ml	mmol l ⁻¹	ml	mmol l ⁻¹
KCl	37.3 0.5	15.1	15.1	6.9	6.9	6.8	6.8
KH ₂ PO ₄	68 0.5	3.7	3.7	0.9	0.9	0.8	0.8
NaHCO ₃	84 1	6.8	13.6	12.5	25	42.5	85
NaCl	117 2	—	—	11.8	47.2	9.6	38.4
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	30.5 0.15	0.5	0.15	0.4	0.1	1.1	0.33
(NH ₄) ₂ CO ₃	48 0.5	0.06	0.06	0.5	0.5	—	—
Korekce pH							
mol l ⁻¹		ml	mmol l ⁻¹	ml	mmol l ⁻¹	ml	mmol l ⁻¹
NaOH	1	—	—	—	—	—	—
HCl	6	0.09	1.1	1.3	15.6	0.7	8.4
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂ se do zásobních roztoků nepřidává, protože by mohlo dojít k vysrážení. Přidává se pouze do směsi trávicích tekutin							
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂	g l ⁻¹	mmol l ⁻¹	mmol l ⁻¹		mmol l ⁻¹		mmol l ⁻¹
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂	44.1	0.3	1.5 (0.75*)		0.15 (0.075*)		0.6 (0.3*)

4.3 Fermentace

4.3.1 Fermentační médium

Fermentační médium bylo připraveno z 2,25 g tryptonu, 2,25 g glukózy, 1,125 g maltózy a 2,25 g kvasničného extraktu. Dále bylo přidáno 50,7 µl vitamínu K₁ (0,5 mg/l), 5,07 mg heminu (5 mg/l) rozpuštěných v 450 ml destilované vody a 225 ml uhličitanového pufru (4 g NH₄HCO₃, 35 g NaHCO₃ tdoplněné destilovanou vodou do objemu 1 litr), 225 ml makrominerálního roztoku (5,7 g Na₂HPO₄, 6,2 g KH₂PO₄, 0,3 g MgSO₄, doplněné destilovanou vodou do objemu 1 litr), 112,5 µl mikrominerálního roztoku (2,5 g CaCl₂, 2,5 g MnCl₂*4H₂O, 0,25 g CoCl₂ * 6H₂O, 1,25 g FeCl₃, doplněné destilovanou vodou do objemu 25 ml) a 1,125 ml 0,1 % roztoku resazurinu.

4.3.2 Redukční roztok

Před experimentem byl připraven čerstvý redukční roztok z 312,5 mg cystein hydrochloridu, 2 ml 1M NaOH, 101,5 mg Na₂S*9H₂O a 50 ml destilované vody.

4.3.3 Fosfátový pufr

Fosfátový pufr o hodnotě pH 7 při teplotě 20 °C byl připraven smícháním 610 ml 1/15M Na₂HPO₄ a 390 ml 1/15M KH₂PO₄.

4.3.4 Příprava fermentačních mikrozkuvek

Připravené fermentační medium bylo přivedeno k varu po dobu 5 až 7 minut a následně ochlazeno na teplotu 37 °C za stálého přívodu dusíku. Nasledně bylo pH upraveno na hodnotu 7 pomocí 6M HCl. Poté bylo 835 µl fermentačního media a 40 µl redukčního roztoku

pipetováno do mikrozkušavek Eppendorf. Takto připravené mikrozkušavky byly zavakuovány v papírových krabičkách společně a anaerogenem (Biomérieux, Lyon, Francie) a uloženy v anaerobní atmosféře při teplotě 4 °C až do dalšího dne.

4.3.5 Odběr a příprava vzorků stolice

Vzorky stolice byly odebrány v en fermentačního experimentu od 4 dárců bez dietních omezení, bez užívání antibiotik minimálně 3 měsíce před odběrem nebo bez trávicích potíží. Vzorky byly odebrány pomocí jednorázových sad a uzavřeny v sáčku společně s anaerogenem. Vzorky stolice byly zpracovány na fekální suspenzi do 2 hodin od odběru. Všechny vzorky byly odebrány na České zemědělské univerzitě v Praze. Vzorek stolice o hmotnosti 24 g byl homogenizován s fosfátovým pufrům (75 ml) v přístroji stomacher (Laboratory Blender, Stomacher® 400 Circulator, EU), aby se získala 32 % směs. Finální fekální suspenze vznikla přefiltrováním 32 % směsi přes nylonový filtr.

4.3.6 Proces fermentace

Minimálně dvě hodiny před samotným začátkem fermentace byly den předem připravené mikrozkušavky s fermentačním médiem a redukčním roztokem umístěny v anaerobní atmosféře do inkubátoru (Memmert, Německo) s teplotou 37 °C. Poté byly mikrozkušavky vyndány a bylo do nich přidáno 100 µl fekální suspenze (nebo fosfátového pufru v případě kontrolního vzorku). Dále bylo přidáno 25 µl roztoku thymolu, nebo thymochinonu, nebo thymohydrochinonu, nebo zatarosidu (s konečnou koncentrací 50 µg/ml) nebo DMSO pro kontrolu, zvláště do každé mikrozkušavky. Mikrozkušavky byly opět uzavřeny v papírových krabičkách do vakuovacích pytlíků společně s anaerogenem a umístěny na horizontální třepačku (Grant-bio, PMS-1000i, EU) do inkubátoru (37 °C, 100 rpm). V časech 0, 4 a 24 hodin bylo postupně odebíráno z mikrozkušavek 950 µl vzorku a smícháno s 50 µl azidu sodného pro ukončení fermentace (finální koncentrace NaN₃ ve vzorcích byla 1,5 mg/ml). Takto připravené vzorky ihned umístěny a uskladněny při teplotě -80 °C až do konečné analýzy.

4.4 Analýza vzorků

Vzorky z *in-vitro* fermentací byly rozmrazeny při pokojové teplotě. Pro vysrážení bílkovin před měřením byly rozmrazené vzorky zhomogenizovány na vortexu a 200 µl vzorku bylo smícháno s 200 µl metanolu, znovu zhomogenizováno na vortexu a uloženo na 24 hodin při teplotě -18 °C. Po uplynutí této doby byly vzorky přečištěny centrifugací (4 °C, 15000 rpm, 10 min). Následně bylo z přečištěných vzorků odebráno 50 µl supernatantu, k nimž bylo přidáno 900 µl rozpouštědla (voda a metanol, 1:1). Společně se vzorky fermentací byly k měření připraveny i kalibrační roztoky standardů v koncentracích: 20; 50; 100; 200; a 500 ng/ml. Dále byly připraveny slepé vzorky rozpouštědla (voda a metanol, 1:1).

Extrahované vzorky a kontrolní vzorky kvality byly zředěny nebo rozpuštěny (voda a metanol, 1:1).

Měření vzorků:

Vzorky fermentace zatarosidu byly analyzovány pomocí ultravysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC) Ultimate 3000 (Thermo Scientific, USA) ve spojení s hmotnostním

analyzátořem Q–TOF Impact II (Bruker Daltonik GmbH, Německo) s ultravysokým rozlišením a přesným určením hmoty (HRAM) analytů

Použitá kolona: Acclaim™ RSLC 120 C18, 2,2 μm, 120Å 2,1x100 mm (Thermo Fisher Scientific, USA)

S předkolonkou: ACQUITY UHPLC®BEH C18 1,7 μm 3/Pk, 2,1x5 mm (VanGuard, Irsko)

Průtok: 0,250 ml/min

Teplota: 40 °C

Doba analýzy: 20 min.

Nástřik: 5 μl

Gradient: mobilní fáze A: 0,2 % kyselina mravenčí, v/v
mobilní fáze B: metanol, v/v

V čase: nula byl průtok – 5 %, 10 min – 100 %, 12 min – 100 %, 13 min – 5 %, 20 min – 5 %.

Pro analýzu byl použit jako iontový zdroj elektrosprej (ESI) a vlastní měření obsahových látek probíhalo v pozitivním módu.

Software:

Compass otofControl 5.2 (Bruker Daltonik, Německo)

Compass HyStar 5.1 (Bruker Daltonik GmbH, USA).

Výsledky byly vyhodnoceny programem DataAnalysis (Bruker Daltonik, Německo).

Screening a srovnání bylo prováděno programem TasQ client 4.3 (Bruker Daltonik GmbH, USA).

Vzorky monoterpenoidů také analyzovány pomocí GC / FID (Agilent Technologies 7890 A) s použitím kolony Agilent 19091 S-433, 30 m x 250 μm x 0.25 μm, režim nástřiku Split 230 °C, nástřik 1 μl, teplotní program 0 min – 100 °C, 3 min při 118 °C, 20 min – 300 °C, teplota detektoru 300 °C.

Statistické zpracování bylo provedeno v programech Microsoft Excel, Statistica 13.3 (TIBCO Software, USA), kde bylo využito metody analýzy ANOVA s post-hoc Tukey-ho HSD testem.

5 Výsledky

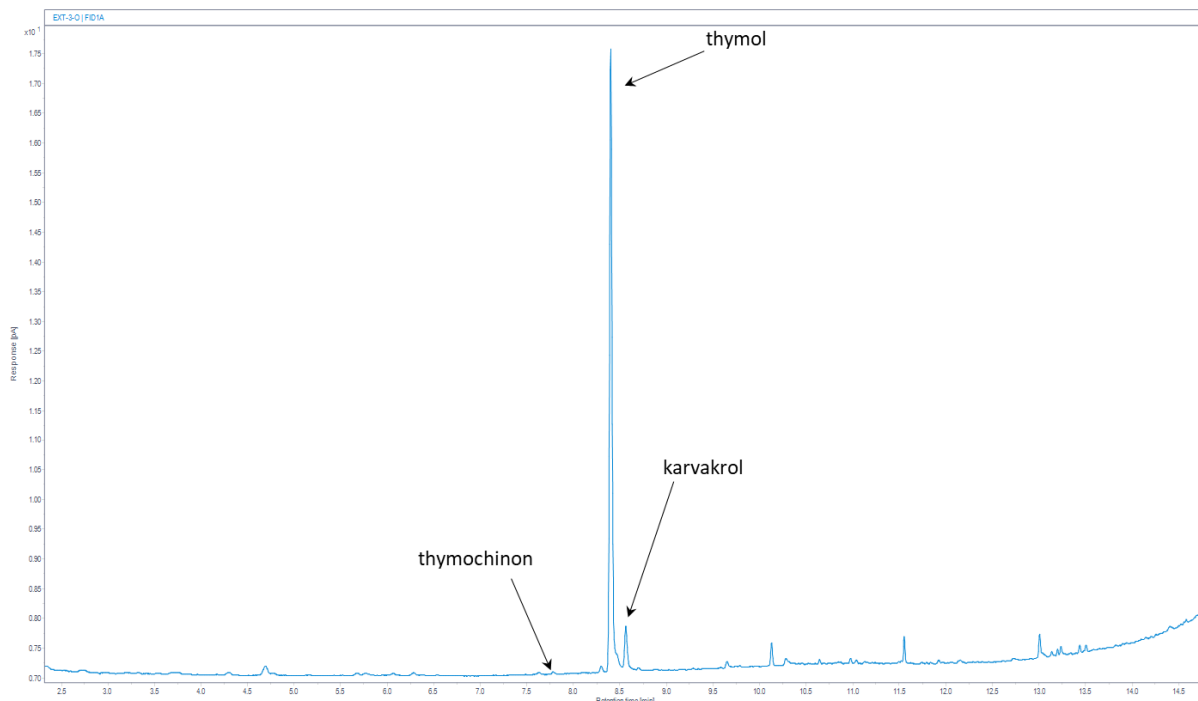
Nejprve byl proveden experiment testující stabilitu hlavních biologicky aktivních metabolitů tymiánu v modelu proximální části trávicího traktu, který zahrnoval podmínky v ústní dutině (orální fáze) a žaludku (gastrická fáze). V tomto experimentu byly testovány nejvýznamnější biologicky aktivní sekundární metabolity (tab. 3) a metanolvý extrakt tymiánu.

Tabulka 3: Charakteristické hodnoty sledovaných látek na GC/FID (thymol, karvakrol, thymochinon) a LC/MS (pouze zatarosid) použité pro analýzu.

Látka	Sumární vzorec	Mr	Detekovaný ion	m/z detekovaného iontu	Retenční čas [min]
Thymol	$C_{10}H_{14}O$	150,10	-	-	8,3
Karvakrol	$C_{10}H_{14}O$	150,22	-	-	8,5
Thymochinon	$C_{10}H_{12}O_2$	164,20	-	-	7,7
Zatarosid*	$C_{16}H_{24}O_7$	328,1522	$[M+NH_4]^+$	346,1866	4,9

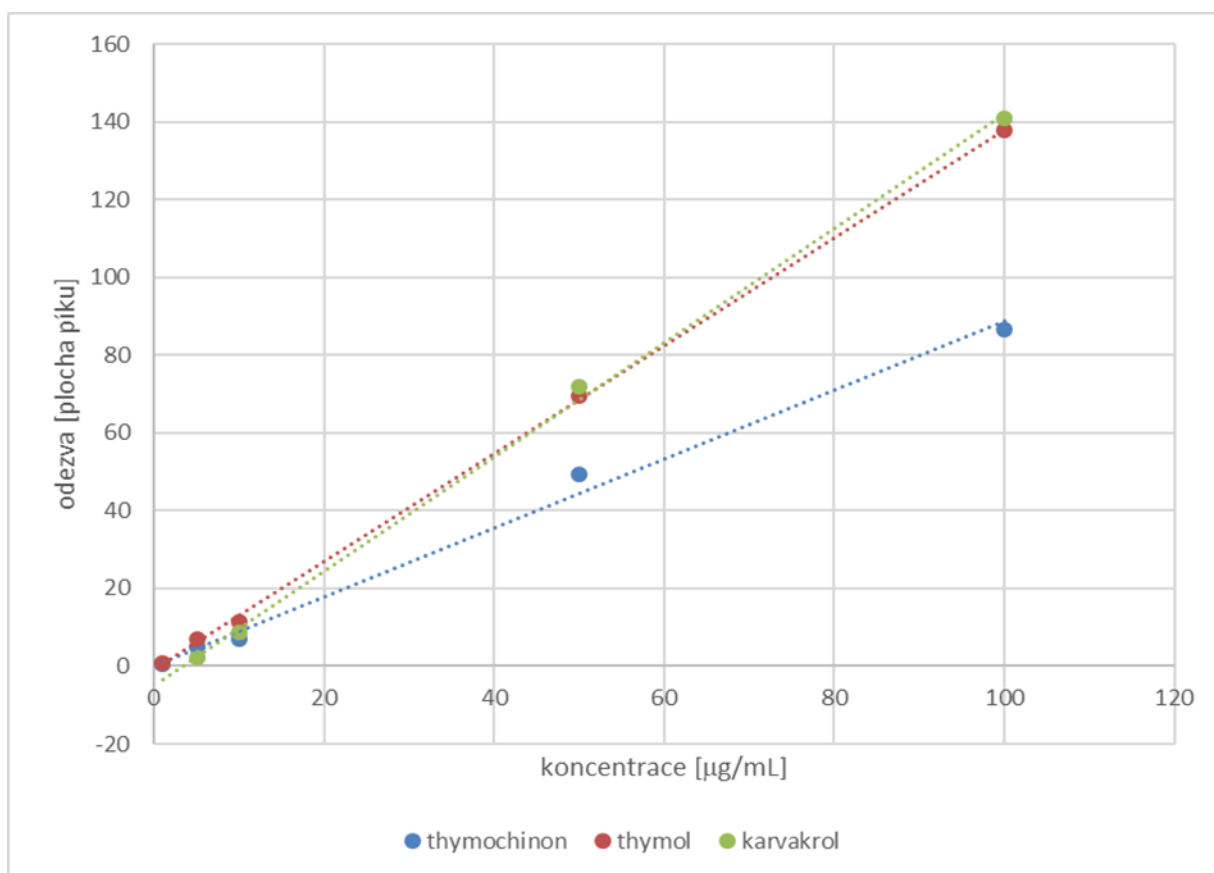
* analyzováno na LC/MS HRAM

Relativní zastoupení těchto látek v testovaném MeOH extraktu tymiánu je ukázáno na GC/FID chromatogramu (obr. 6).



Obrázek 6: GC/FID chromatogram testovaného metanolvého extraktu tymiánu (100 μ g/ml).

Pro přesné určení koncentrací měřených látek byla provedena kalibrace na 5 koncentračních hladinách (1-100 µg). Kalibrační přímky jsou zobrazeny na obr. 7 a v tabulce 4 jsou uvedeny parametry kalibrace.



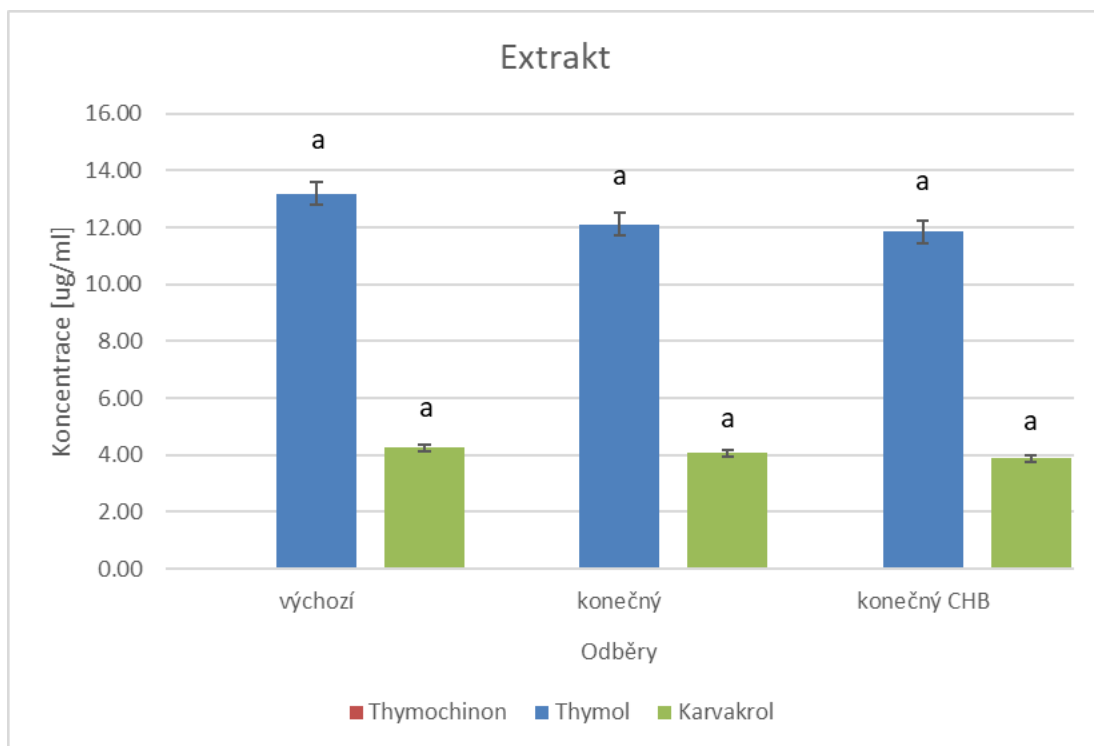
Obrázek 7: Kalibrační přímky pro thymochinon, thymol a karvakrol na GC/FID.

Odezvy thymolu a karvakrolu byly v průběhu kalibrace podobné, což odpovídá podobnosti jejich chemických struktur. Odezva thymochinonu byla oproti nim nižší (viz obr. 7).

Tabulka 4: Parametry kalibrace thymochinonu, thymolu a karvakrolu (R^2 – koeficient determinace).

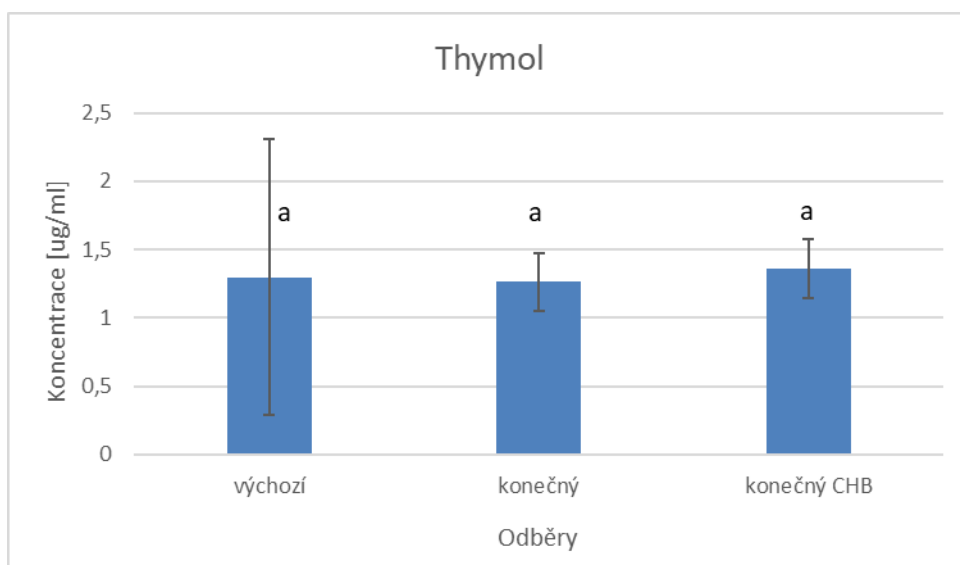
	Rovnice přímky	R^2
Karvakrol	$y = 1,47x - 4,7482$	0,9988
Thymol	$y = 1,39x - 0,8496$	0,9997
Thymochinon	$y = 0,8851x + 0,2102$	0,9943

Na obrázcích 8 až 11 jsou výsledky experimentu. Po kvantifikaci složek extraktu bylo zjištěno, že thymochinon byl obsažen v extraktu pouze ve stopovém množství, které nešlo kvantifikovat.



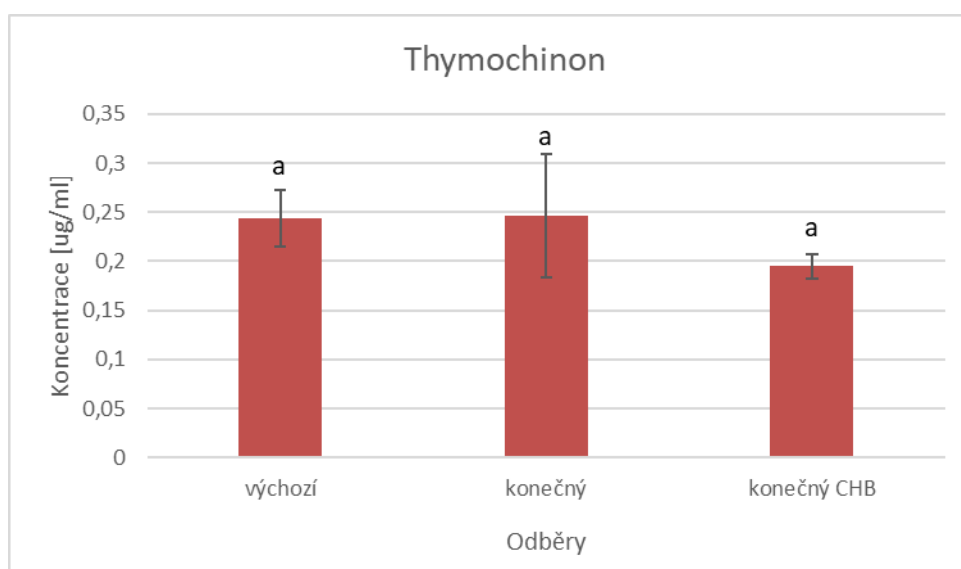
Obrázek 8: Změny obsahu látek v metanolvém extraktu tymiánu po ošetření modelem proximální části trávicího traktu. Statistická významnost rozdílů byla testována pomocí ANOVA (Tukey post-hoc test) na hladině $p = 0.05$.

Statistická významnost byla ověřena pomocí programu Statistica 13.3 (TIBCO Software, USA), kde byla použita metoda analýzy ANOVA a Tukey-ho HSD test. Z názorného srovnání obsahu látek v metanolvém extraktu tymiánu po ošetření modelem proximální části trávicího traktu na obrázku 8 vyplývá, že mezi výchozími a konečnými vzorky nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v obsahu thymolu a karvakrolu. Obsah thymolu měl nejvýznamnější odchylku od karvakrolu a thymochinonu a byl o 8,16 % vyšší, zatímco u karvakrolu byl o 4,45 % nižší.



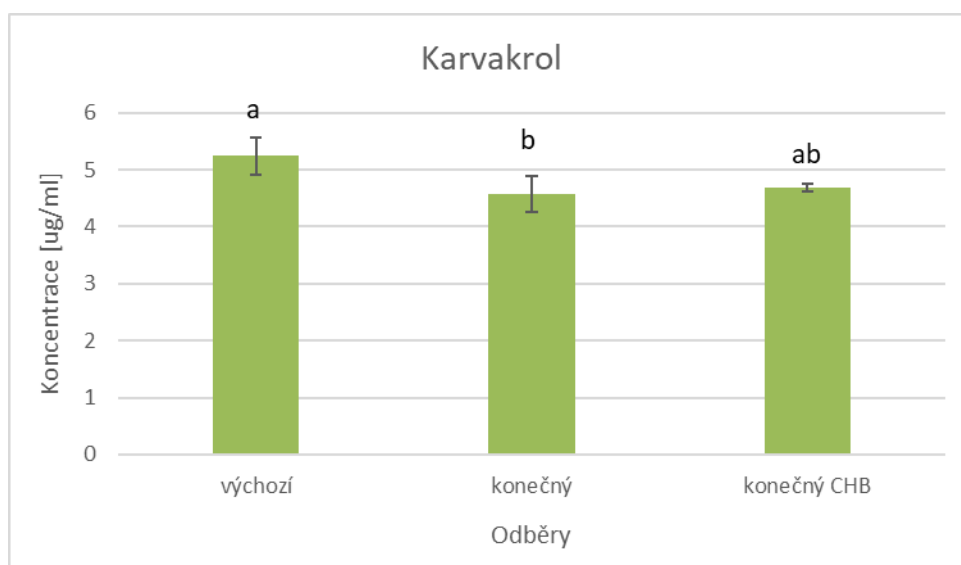
Obrázek 9: Změny obsahu thymolu po ošetření modelem proximální části trávicího traktu. Statistická významnost rozdílů byla testována pomocí ANOVA (Tukey post-hoc test) na hladině $p = 0.05$.

U thymolu nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi výchozím a konečným vzorkem po simulaci průchodu proximální části trávicího traktu. Koncentrace thymolu nevykazovaly žádné signifikantní rozdíly. Docházelo k poklesu koncentrace o 2,79 %.



Obrázek 10: Změny obsahu thymochinonu po ošetření modelem proximální části trávicího traktu. Statistická významnost rozdílů byla testována pomocí ANOVA (Tukey post-hoc test) na hladině $p = 0.05$.

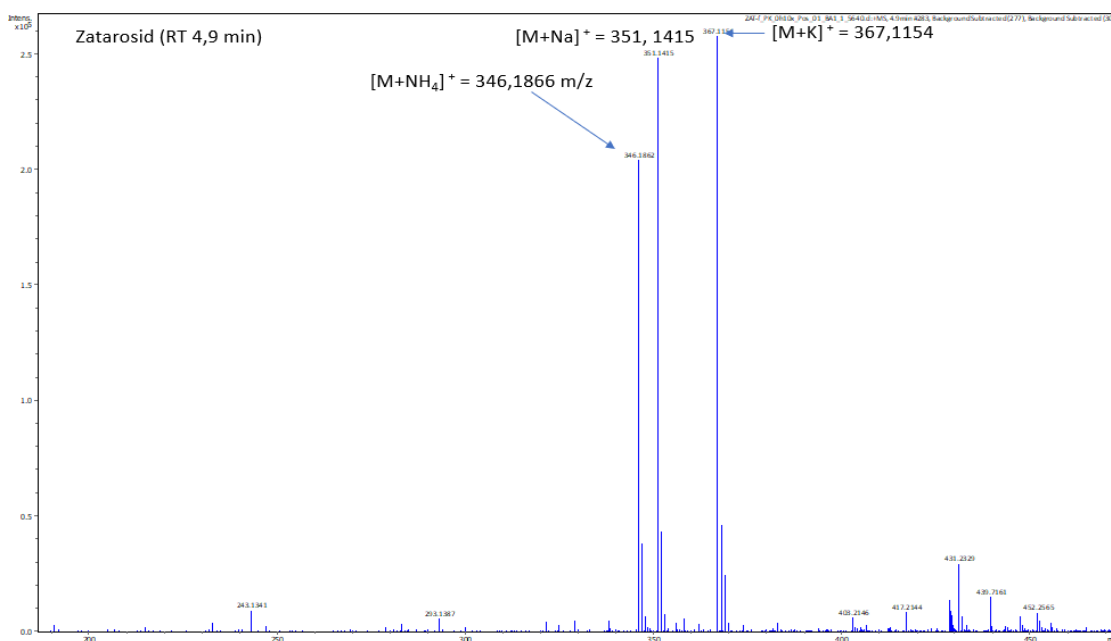
Po simulaci průchodu proximální části trávicího traktu nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly v koncentraci thymochinonu a thymolu.



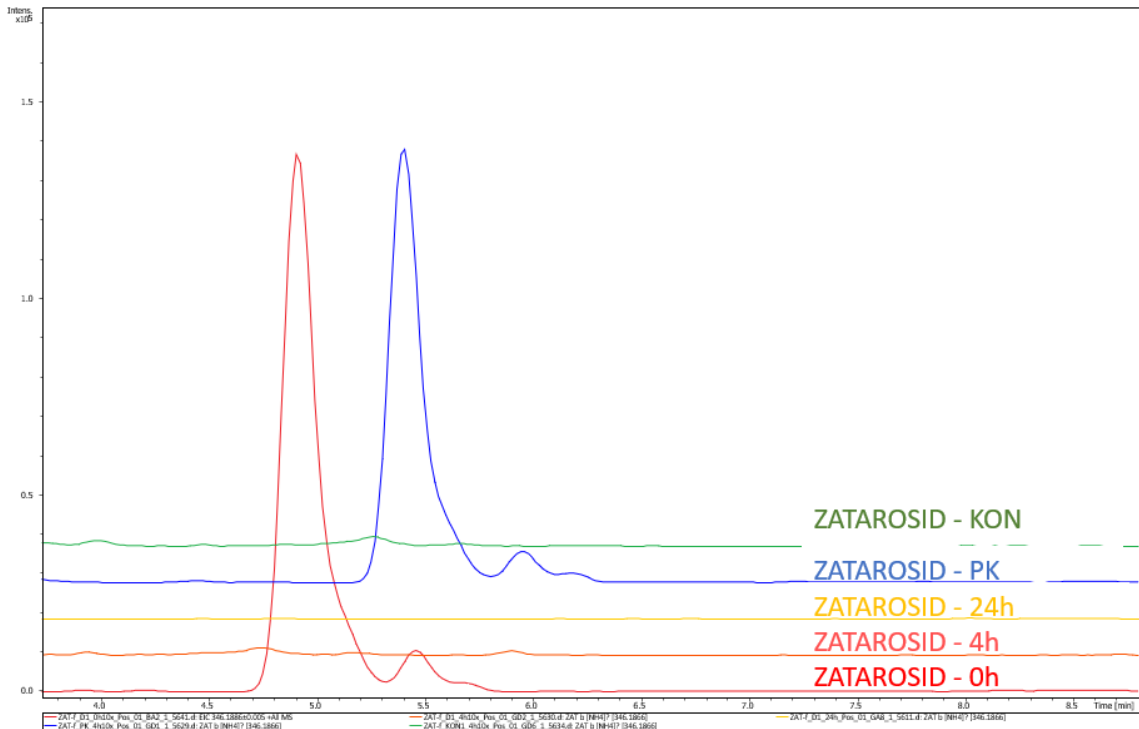
Obrázek 11: Změny obsahu karvakrolu po ošetření modelem proximální části trávicího traktu. Statistická významnost rozdílů byla testována pomocí ANOVA (Tukey post-hoc test) na hladině $p = 0.05$.

Na rozdíl od thymolu a thymochinonu byl u karvakrolu zaznamenán rozdíl mezi výchozími a konečnými vzorky na modelu proximálního gastrointestinálního traktu, jak je patrné na obrázku 11. Karvakrol vykazoval snížení o 12 %.

Na základě výsledků z proximální části trávicího traktu byl proveden následující experiment, který ověřoval stabilitu vybraných látek v tlustém střevě, kde dochází k jejich interakci se střevní mikroflórou. Pro fermentační testy s izoláty střevní mikroflóry 4 dárců byly vybrány thymol, thymochinon a jeho redukovaná forma thymohydrochinon a jeho glykosid zatarosid. Vzorky s terpenoidy byly měřeny pomocí GC/FID, vzorky se zatarosidem byly analyzovány pomocí LC/MS s ultravysokým rozlišením. Proto byly provedeny optimalizace analýzy zatarosidu v této matici, kde bylo v MS spektrech nalezeno množství adduktů, ze kterých byly nejintenzivnější $[M+K]^+$ s m/z 367,1154, $[M+NH_4]^+$ s m/z 346,1866 a $[M+Na]^+$ s m/z 351,1415, jak je vidět na obrázku 11. Protonovaný iont $[M+H]^+$ s m/z 329,1600 byl pouze zanedbatelný, proto byl pro analýzu vybrán amonný addukt $[M+NH_4]^+$ (tab. 3). Retenční čas zatarosidu byl 4,9 minut.

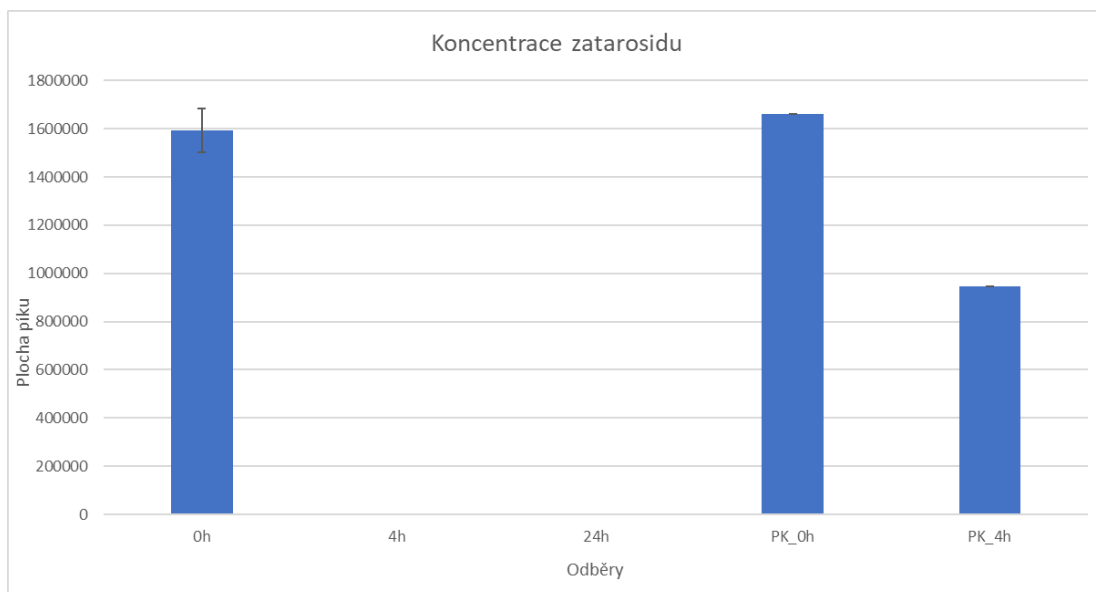


Obrázek 11: Hmotnostní spektrum zatarosidu na přístroji LC /MS.



Obrázek 12: Chromatogramy zatarosidu na přístroji LC/MS v různých časech odběru v porovnání s pozitivní kontrolou (PK – médium se zatarosidem bez mikroflóry po 4 hod.) a negativní kontrolou (KON – mikroflóra bez zatarosidu).

Na obrázku 12 je porovnán pík zatarosidu v různých odběrových časech s pozitivní kontrolou po 24hodinové inkubaci bez mikroflóry a kontrolním vzorkem (pouze mikroflóra, bez zatarosidu). Z obrázku je zřejmé, že zatarosid byl přítomný pouze na počátku fermentace v čase 0 hod. a po 4 hodinách byl už zcela metabolizován mikroflórou trávicího traktu, kdežto ve vzorku pozitivní kontroly (PK – zatarosid v kultivačním médiu bez mikroflóry) byl výrazný pík i po 4 hodinách inkubace. Ale i ve vzorcích PK došlo po 24 hodinách k jeho výraznému snížení, co naznačuje, že i v kultivačním médiu po delší době dochází k jeho degradaci. U ostatních látek (konkrétně u thymolu a thymochinonu), které bylo zjištěno pomocí GC/FID, došlo k jejich úplné degradaci v prostředí již po 4 hodinách.



Obrázek 12: Relativní porovnání odezvy adduktů $[M+NH_4]^+$ zatarosidu ve vzorcích fermentace v různých odběrových časech naměřené pomocí LC/MS s ultravysokým rozlišením. *Úsečky v grafu znázorňují směrodatnou odchylku. PK – je pozitivní kontrola.

V obrázku 12 znázorňuje relativní kvantifikace vzorku zatarosidu během fermentace v několika časových bodech a jeho srovnání s pozitivní kontrolou. Ubytek v pozitivní kontrole po 4 hodinách byl zhruba 43,04 %.

6 Diskuze

Cílem této studie bylo zjistit, zda dochází k metabolismu hlavních složek tymiánové silice, jsou thymol, karvakrol, thymochinon, a jeho redukováná forma thymohydrochinon a jeho glykosid zatarosid, při průchodu lidským trávicím traktem.

Hypotéza, že při průchodu trávicím traktem dochází k chemickým změnám složek tymiánového extraktu, byla potvrzena na základě experimentálních výsledků. Ty ukázaly, že složky tymiánového extraktu, jako karvakrol, thymol a zatarosid, mohou být během trávení v lidském těle metabolizovány na různé sloučeniny. Například karvakrol vykazoval pokles o 12 % po průchodu proximálním gastrointestinálním traktem, což naznačuje, že se tato sloučenina mohla metabolizovat během trávení. Podobně se thymol a zatarosid ukázaly jako nestabilní, což naznačuje, že mohou být metabolizovány mikrobiální aktivitou. Tento proces metabolismu může mít vliv na biologickou aktivitu a účinky tymiánové silice. Proto můžeme potvrdit, že složky tymiánového extraktu procházející trávicím traktem mohou podstoupit chemické změny, které ovlivňují jejich biologickou aktivitu a účinky v lidském těle.

Ve svém výzkumu Salehi et al. (2018) zkoumali možnosti využití thymolu a tymiánu v různých aplikacích. Výsledky in vitro studie ukázaly, že tymiánová silice a její hlavní složky, včetně thymolu, měly antibakteriální aktivitu proti patogenům způsobujícím respirační onemocnění, jako jsou *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* a *Staphylococcus aureus*. Tyto silice byly účinnější než silice jiných rostlin a projevíly minimální inhibiční dávku 3,13-6,25 mg/l vzduchu. Ve našem studii byly thymol a karvakrol stabilní při simulovaném průchodu proximálním gastrointestinálním traktem a nedocházelo k významnému poklesu jejich koncentrace. Tato zjištění jsou významná pro využití thymolu a tymiánu v potravinářském průmyslu, jelikož tyto látky mohou být použity jako přírodní konzervanty. Je tedy možné tyto přírodní látky využít pro prodloužení trvanlivosti potravin a ochranu proti bakteriálním infekcím.

Studie Modráčkové et al. (2020) ukázala, že bifidobakterie mohou degradovat některé glykosidy studovaných látek, ale jejich schopnost se liší v závislosti na druhu a kmeni bifidobakterií. Je proto důležité zvážit, které konkrétní kmeny *Bifidobacterium spp.* se podílejí na metabolismu rostlinných glykosidů. Je pozoruhodné, že tyto chemické sloučeniny se v rostlinách vyskytují jak ve volné, tak ve vázané glykosidové formě. Tato zjištění jsou důležitá pro náš současný výzkum metabolismu hlavních složek tymiánové silice, mezi něž patří thymol, karvakrol, thymochinon a jeho redukováná forma thymohydrochinon a jeho glykosid zatarosid, během průchodu lidským trávicím traktem a jak mohou ovlivnit mikroflóru. Pochopení metabolismu těchto fenolických derivátů je zásadní pro posouzení jejich potenciálních zdravotních účinků (Rathod et al. 2021; Dvořáková et al. 2011).

Vzhledem k vysokým nákladům, obtížnosti a etickým problémům spojeným se zkouškami na lidech byly ve vědě o potravinách a výživě vyvinuty alternativy *in vitro*, které simulují trávení. Použití různých modelů trávení však může vést k obtížím při porovnávání výsledků mezi výzkumnými týmy kvůli rozdílům v enzymech, pH, typu minerálů, iontové síle, době trávení a přítomnosti různých sloučenin. Výsledky ukázaly, že thymol a karvakrol jsou stabilní v simulovaných podmínkách. Tato studie dále zdůraznila důležitost adaptovat in vitro modely na specifickou výzkumnou otázku a určit klíčové parametry a podmínky pro studium konkrétního potravinového produktu nebo substrátu (Guerra et al. 2012; Minekus et al. 2014).

7 Závěr

- Rostliny produčují primární a sekundární metabolity, z nichž sekundární metabolity, jako jsou silice, mají různé biologické funkce a mohou být využity v lékařství a v potravinářském průmyslu. Tymián obsahuje mnoho účinných látek, jsou thymol a karvakrol, které mají protizánětlivé, antibakteriální a antioxidační účinky. Informace o stabilitě a metabolismu jednotlivých složek silice z tymiánu v lidském těle jsou poměrně omezené a tato diplomová práce se zaměřuje na jejich výzkum.
- Thymol a karvakrol se ukázaly jako stabilní během simulovaného průchodu proximálním gastrointestinálním traktem a nevykazovaly žádné významné rozdíly v koncentraci. Nicméně, karvakrol vykazoval statisticky významný pokles o 12 % po průchodu proximálním gastrointestinálním traktem, což naznačuje, že se tato sloučenina mohla degradovat během trávení již v proximální části trávicího traktu.
- Ve fermentačním modelu in vitro simulujícím procesy v tlustém střevě nebyly zjištěny žádné koncentrace thymochinonu již ve výchozích roztocích pufřů ve vzorcích pozitivní kontroly ihned po jejich přidání (čas odběru 0), což je zřejmě důsledek jejich chemické interakce se složkami média. Naproti tomu thymol a zatarosid se ukázaly být ve vzorcích čistého pufru stabilnější a k jejich rychlé degradaci docházelo pouze ve vzorcích se střevní mikroflórou, což naznačuje, že mohou být metabolizovány mikrobiální aktivitou v tlustém střevě.
- Celkově tyto výsledky naznačují, že obsahové biologicky aktivní obsahové látky tymiánu mohou být během trávení v lidském těle metabolizovány až v intestinální fázi, a to především v tlustém střevě, což může mít vliv na biologickou aktivitu a účinky tymiánu a jeho složek.

8 Literatura

- Adams M, Moss M. 2008. Food Microbiology. The Royal Society of Chemistry, UK.
- Ahmad A, Raish M, Alkharfy KM. 2021. The potential role of thymoquinone in preventing the cardiovascular complications of COVID-19. *Vascular Pharmacology* **141**.
- Alkharfy KM, Ahmad A, Jan BL. 2018. Thymoquinone reduces mortality and suppresses early acute inflammatory markers of sepsis in a mouse model. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **98**: 801-805.
- Almanea A, Abd El-Aziz GS, Ahmed MMM. 2019. The potential gastrointestinal health benefits of *Thymus vulgaris* essential oil: A review. *Biomedical and Pharmacology Journal* **12**: 1793-1799.
- Ares AM, Nozal MJ, Bernal JL, Bernal J. 2020. Simultaneous determination of carvacrol and thymol in bee pollen by using a simple and efficient solvent extraction method and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **181**.
- Asha D, Mathew L. 2017. Chemical profiling of *Thymus vulgaris* L. using HPTLC. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* **6**: 1017-1023.
- Ashraf S, Ahmad Anjum A, Ahmad A. 2017. *In vitro* activity of *Nigella sativa* against antibiotic resistant *Salmonella enterica*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **58**: 54-58.
- Azman M, Sabri A. H. 2022. Intestinal Absorption Study: Challenges and Absorption Enhancement Strategies in Improving Oral Drug Delivery. *Pharmaceuticals* **15**: 975.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, **94**: 223–253.
- Bäckhed, F., Fraser, C. M., Ringel, Y., Sanders, M. E., Sartor, R. B., Sherman, P. M. 2012. Defining a healthy human gut microbiome: Current concepts, future directions, and clinical applications. *Cell Host & Microbe* **12**: 611–622.
- Borugă O, Jianu C, Mișcă C, Goleț I, Gruia AT, Horhat FG. 2014. *Thymus vulgaris* essential oil: chemical composition and antimicrobial activity. *J Med Life* **7**: 56-60.
- Cao Yu, Liu H, Ningbo. 2020. Impact of food additives on the composition and function of gut microbiota: A review. *Trends in Food Science & Technology* **99**: 295–310.
- Chen F, Tholl D. 2011. The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. *The Plant Journal* **66**.
- Christianson D.W. 2017. Structural and Chemical Biology of Terpenoid Cyclases. *Chemical Reviews* **117**.
- Churklam W, Chaturongakul S, Ngamwongsatit B. 2020. The mechanisms of action of carvacrol and its synergism with nisin against *Listeria monocytogenes* on sliced bologna sausage. *Food Control* **108**.
- Cicalău GIP, Babes PA, Calniceanu H, Popa A, Ciavoi G, Iova GM, Ganea M, Scrobotă I. 2021. Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of Carvacrol and Magnolol, in Periodontal Disease and Diabetes Mellitus. *Molecules* **26**.
- Clemente, J. C., Ursell, L. K., Parfrey, L. W., & Knight, R. (2012). The impact of the gut microbiota on human health: An integrative view. *Cell* **148**: 1258–1270.

- Cosentino S, Tuberoso C. I. G., Pisano B, Satta M, Mascia V, Arzedi E, Palmas F. 1999. *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology* **29**: 130–135.
- Costa MF, Durço AO, Rabelo TK, Barreto RSS, Guimarães AG. 2019. Effects of Carvacrol, Thymol and essential oils containing such monoterpenes on wound healing: a systematic review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **71**:141–155.
- Cox-Georgian D, Ramadoss N, Dona C. 2019. Therapeutic and Medicinal Uses of Terpenes. *Medicinal Plants* 333–359
- Croteau R, Sood VK. 1985. Metabolism of Monoterpenes: Evidence for the Function of Monoterpene Catabolism in Peppermint (*Mentha piperita*) Rhizomes. *Plant Physiology* **77**: 801.
- Dauqan E, Abdullah A. 2017. Medicinal and Functional Values of Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Herb. *Journal of Applied Biology & Biotechnology* **5**: 017-022.
- Dvořáková M, Valterová I, Vaněk T. 2011. Monoterpeny v rostlinách. *Chemicke Listy* **105**: 839–845.
- Diniz do Nascimento L, Moraes AAB, Costa KSD, Pereira Galúcio JM, Taube PS. 2020. Bioactive Natural Compounds and Antioxidant Activity of Essential Oils from Spice Plants: New Findings and Potential Applications. *Biomolecules* **10**: 988.
- Di L, Kerns EH. 2009. Stability challenges in drug discovery.
- Edreva A, Velikova V, Tsonev T. 2008. Stress-protective role of secondary metabolites: diversity of functions and mechanisms. *Gen. Appl. plant physiology* **34**: 67-78.
- Erb M. 2018. Volatiles as inducers and suppressors of plant defense and immunity — origins, specificity, perception and signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **44**:117–121.
- Erb M, Kliebenstein DJ. 2020. Plant Secondary Metabolites as Defenses, Regulators, and Primary Metabolites: The Blurred Functional Trichotomy1[OPEN]. *Plant Physiology* **184**:39–52.
- Erb M, Reymond P. 2019. Molecular Interactions between Plants and Insect Herbivores. *Annual Review of Plant Biology* **70**: 4.1–4.31.
- Ezz-Eldin YM, Aboseif AA, Khalaf MM. 2020. Potential anti-inflammatory and immunomodulatory effects of carvacrol against ovalbumin-induced asthma in rats. *Life Sciences* **242**.
- Fan K, Li X, Cao Y, Qi H, Li L, Zhang Q, Sun H. 2015. Carvacrol inhibits proliferation and induces apoptosis in human colon cancer cells. *Anti-cancer drugs* **26**: 813-823.
- Grigore A, Paraschiv I, Colceru-Mihul S, Bubueanu C, Draghici E, & Ichim M. 2010. Chemical composition and antioxidant activity of *Thymus vulgaris* L. volatile oil obtained by two different methods. *Romanian Biotechnological Letters* **15**: 5436–5443.
- Guerra A, Etienne-Mesmin L, Livrelli V, Denis S. 2012. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in Biotechnology* **30**.
- Gali-Muhtasib H, Roessner A, Schneider-Stock R. 2006. Thymoquinone: A promising anti-cancer drug from natural sources. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **38**: 1249–1253.
- Hanková K. 2021. Antimikrobiální aktivita derivátů thymochinonu [MSc. Thesis]. Czech University of Life Sciences Prague, Prague.

- Halamova K, Kokoska L, Flesar J, Sklenickova O, Svobodova B, Marsik P. 2010. *In Vitro* Antifungal Effect of Black Cumin Seed Quinones against Dairy Spoilage Yeasts at Different Acidity Levels. *Journal of Food Protection* **73**: 2291–2295.
- Hadacek F. 2002. Secondary metabolites as plant traits: Current assessment and future perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **21**:273–322.
- Imran M., Aslam M, Alsagaby S. A, Saeed F, Ahmad I. 2022. Therapeutic application of carvacrol: A comprehensive review. *Food Science & Nutrition* **10**: 3544–3561.
- Ivankovic S, Stojkovic R, Jukic M, Milos M, Jurin M. 2006. The antitumor activity of thymoquinone and thymohydroquinone in vitro and in vivo. *Experimental Oncology* **28**.
- Idris-Khodja N, Schini-Kerth V. 2012. Thymoquinone improves aging-related endothelial dysfunction in the rat mesenteric artery. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **385**: 749–758.
- Jamali T, Kavooosi G, Ardestani SK. 2020. *In-vitro* and *in vivo* anti-breast cancer activity of OEO (Oliveria decumbens vent essential oil) through promoting the apoptosis and immunomodulatory effects. *Journal of ethnopharmacology* **248**.
- Jrah Harzallah H, Kouidhi B, Flamini G, Bakhrouf A, Mahjoub T. 2011. Chemical composition, antimicrobial potential against cariogenic bacteria and cytotoxic activity of Tunisian *Nigella sativa* essential oil and thymoquinone. *Food Chemistry* **129**:1469–1474.
- Jukic M, Politeo O, Maksimovic M, Milos M, Milos M. 2007. *In vitro* acetylcholinesterase inhibitory properties of thymol, carvacrol and their derivatives thymoquinone and thymohydroquinone. *Phytotherapy Research* **21**.
- Kai F, Xiaolei L, Yonggang C. 2015. Carvacrol inhibits proliferation and induces apoptosis in human colon cancer cells. *Anti-Cancer Drugs* **26**: 813-823.
- Karapinar M, Esen Aktuğ Ş. 1987. Inhibition of foodborne pathogens by thymol, eugenol, menthol and anethole. *International Journal of Food Microbiology* **4**:161–166.
- Keith RA, Mitchell-Olds T. 2017. Testing the optimal defense hypothesis in nature: Variation for glucosinolate profiles within plants. *Plos one* **12**.
- Khan F, Pandey P, Maqsood R, Upadhyay TK. 2023. Anticancer effects of carvacrol in *in vitro* and *in vivo* models: a comprehensive review. *Biointerface Res. Appl. Chem* **13**:290-303.
- Khan H, Khan Z, Amin S, Mabkhot YN, Mubarak MS, Hadda T Ben, Maione F. 2017. Plant bioactive molecules bearing glycosides as lead compounds for the treatment of fungal infection: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **93**: 498–509
- Kim M, Sowndhararajan K, Kim S. 2022. The Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oil from Korean Native Thyme Bak-Ri-Hyang (*Thymus quinquecostatus Celak.*). *Molecules* **27**.
- Korbelář J, Endris Z. 1981. Naše rostliny v lékařství. Avicenum zdravotnické nakladatelství, Praha.
- Kowalczyk A, Przychodna M, Sopata S. 2020. Thymol and Thyme Essential Oil — New Insights into Selected Therapeutic Applications. *Molecules Journals* **25**. 4125.
- Kruk I, Michalska T, Lichszteld K, Kladna A, Aboul-Enein HY. 2000. The effect of thymol and its derivatives on reactions generating reactive oxygen species. *Chemosphere* **41**.

- Kytidou K et al. 2018. Nicotiana benthamiana α -galactosidase A1.1 can functionally complement human α -galactosidase A deficiency associated with Fabry disease. *Journal of Biological Chemistry* **293**.
- Kytidou K, Artola M, Overkleeft HS, Aerts JMFG. 2020. Plant Glycosides and Glycosidases: A Treasure-Trove for Therapeutics. *Frontiers in Plant Science*. **11**. 357.
- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. E. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, **91**: 453–462.
- Lee B, Yeom M, Shim I, Lee H, Hahm DH. 2020. Inhibitory effect of carvacrol on lipopolysaccharide-induced memory impairment in rats. *Korean Journal of Physiology and Pharmacology* **24**.
- Lindhorst, T.K. 2007. *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*; Wiley-VCH: Weinheim, Germany.
- Lichman BR. 2021. The scaffold-forming steps of plant alkaloid biosynthesis. *Natural Product Reports* **38**.
- Liu Y, Huang L, Kim MY, Cho JY. 2022. The Role of Thymoquinone in Inflammatory Response in Chronic Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* **23**.
- Loreto F, Förster A, Dürr M, Csiky O, Seufert G. 2002. On the monoterpene emission under heat stress and on the increased thermotolerance of leaves of *Quercus Ilex L.* fumigated with selected monoterpenes. *Plant Cell Environ* **21**: 101–107.
- Mannan A, Unnisa F. 2019. Role of biochemicals and other factors affecting biotransformation and drug absorption. *The Pharma Innovation Journal* **8**.
- Marsik P, Kokoska L, Landa P, Nepovim A, Soudek P, Vanek T. 2005. *In vitro* inhibitory effects of thymol and quinones of *Nigella sativa* seeds on cyclooxygenase-1- and -2-catalyzed prostaglandin E2 biosyntheses. *Planta Medica* **71**.
- Markesbery WR. 1997. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radical Biology and Medicine* **23**: 134–147.
- Mediouni S, Jablonski JA, Tsuda S, Barsamian A, Kessing C, Richard A, Valente ST. 2020. Oregano oil and its principal component, carvacrol, inhibit *HIV-1* fusion into target cells. *Journal of virology* **94**.
- Minekus M, Alminger M, Alvito P, Ballance S. 2014. A standardised static in vitro digestion method suitable for food-an international consensus. *Food & function* **5**:1113–1124.
- Modrackova N, Vlkova E, Tejnecky V, Schwab C, Neuzil-Bunesova V. 2020. Bifidobacterium β -Glucosidase Activity and Fermentation of Dietary Plant Glucosides Is Species and Strain Specific. *Microorganisms* **8**: 839.
- Nazzaro F, Fratianni F, De Martino L, Coppola R, De Feo V. 2013. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals* **6**:1451-1474.
- Namdeo, A. G. 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacognosy reviews* **69**: 79.
- Nerio LS, Olivero-Verbel J, Stashenko E. 2010. Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresource Technology* **101**: 372–378. Elsevier.
- Nieto G. 2020. A Review on Applications and Uses of Thymus in the Food Industry. *Plants* **9**: 961.

- Nikolić M, Glamočlija J, Ferreira ICFR, Calhella RC, Fernandes Â, Marković T, Marković D, Giweli A, Soković M. 2014. Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum L.*, *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris L.* essential oils. *Industrial Crops and Products* **52**: 183–190.
- Ninkuu V, Zhang L, Yan J. 2021. Biochemistry of Terpenes and Recent Advances in Plant Protection. *International Journal of Molecular Sciences* **22**.
- Opletal, L. 2016. Přírodní látky a jejich biologická aktivita sv. 3. Praha, Univerzita Karlova v Praze.
- Packiyasothy, E. v, & Kyle, S. (2002). Antimicrobial properties of some herb essential oils. *Food Australia*, **54**: 384–387.
- Pilau MR, Alves SH, Weiblen R, Arenhart S, Cueto AP, Lovato LT. 2011. Antiviral activity of the *Lippia graveolens* (Mexican oregano) essential oil and its main compound carvacrol against human and animal viruses. *Brazilian Journal of Microbiology* **42**:1616-1624.
- Pol IE, Smid EJ. 1999. Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology* **29**.
- Ramadan MF. 2007. Nutritional value, functional properties and nutraceutical applications of black cumin (*Nigella sativa L.*): an overview. *International Journal of Food Science and Technology* **42**: 1208–1218.
- Rathod NB, Kulawik P, Ozogul F. Biological activity of plant-based carvacrol and thymol and their impact on human health and food quality. *Trends in Food Science & Technology* **116**: 733-748.
- Rota MC, Herrera A, Martínez RM. 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control* **19**: 7.
- Rúa J, Del Valle P, de Arriaga D, Fernández-Álvarez L, García-Armesto MR. 2019. Combination of Carvacrol and Thymol: Antimicrobial Activity Against *Staphylococcus aureus* and Antioxidant Activity. *Foodborne Pathog Dis* **16**: 622-629.
- Sabah E, Omayma B, Elidrissi mosatafa, Bouymajane A, Choukrad M. 2021. Comparative Study of Chemical Composition and Physico-Chemical Characteristics of *Thymus Vulgaris*'s Essential Oil Harvested from Deraa-Tafilalet's Region (Morocco) with Previous Studies.
- Salehi, B, Mishra, AP, Shukla, I, et al. 2018. Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses. *Phytotherapy Research* **32**: 1688–1706.
- Sampaio LA, Pina LTS, Serafini MR, Tavares DDS, Guimaraes AG. 2021. Antitumor effects of carvacrol and thymol: A systematic review. *Frontiers in Pharmacology* **12**.
- Semeniuc CA, Pop CR, Rotar AM. 2017. Antibacterial activity and interactions of plant essential oil combinations against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Journal of Food and Drug Analysis* **25**: 403–408.
- Sharifi-Rad J, Salehi B, Schnitzler P, Ayatollahi SA, Kobarfard F, Fathi M, Sharifi-Rad M. 2017. Susceptibility of herpes simplex virus type 1 to monoterpenes thymol, carvacrol, p-cymene and essential oils of *Sinapis arvensis L.*, *Lallemantia royleana Benth.* and *Pulicaria vulgaris Gaertn.* *Cellular and Molecular Biology* **63**:42-47.
- Sharifi-Rad M, Varoni EM, Iriti M, Martorell M, Setzer WN, Del Mar Contreras M. 2018. Carvacrol and human health: A comprehensive review. *Phytotherapy Research* **32**:1675-1687.

- Singletary K. 2016. Thyme history, applications, and overview of potential health benefits. *Nutrition Today* **51**: 40-49.
- Skočibušić M, Bezić N, Dunkić V. 2006. Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from *Satureja subspicata* Vis. growing in Croatia. *Food Chemistry* **96**.
- Spisni E, Petrocelli G, Imbesi V, Spigarelli R, Azzinnari D, Sarti MD, Campieri M, Valerii MC. 2020. Antioxidant, anti-inflammatory, and microbial-modulating activities of essential oils: Implications in colonic pathophysiology. *International Journal of Molecular Sciences* **21**.
- Sonmezdag A, Kelebek H, Selli S. 2016. Characterization of aroma-active and phenolic profiles of wild thyme (*Thymus serpyllum*) by GC-MS-Olfactometry and LC-ESI-MS/MS. *Journal of Food Science and Technology* **53**: 1957–1965.
- Štěpánek J, Tomšovic P. (2000): *Thymus L. – mateřídouška*. – In: Slavík B., Chrtek J, Štěpánková J. *Květena České republiky* **6**: 656–669, Academia, Praha.
- Taborsky J, Kunt M, Kloucek P, Lachman J, Zeleny V, Kokoska L. 2012. Identification of potential sources of thymoquinone and related compounds in *Asteraceae*, *Cupressaceae*, *Lamiaceae*, and *Ranunculaceae* families. *Central European Journal of Chemistry* **10**:1899–1906.
- Tanveer M, Wagner C, ul Haq MI, Ribeiro NC. 2020. Spicing up gastrointestinal health with dietary essential oils. *Phytochem Rev*.
- Takeuchi H, Lu ZG, Fujita T. 2004. New monoterpene glucoside from the aerial parts of thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Biosci. Biotechnol. Biochem* **68**: 1131–1134.
- Tauchen J, Klouček P. 2020. *Léčivé rostliny a jejich biologicky aktivní látky*. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha.
- Thapa D, Losa R, Zweifel B, John Wallace R. 2012. Sensitivity of pathogenic and commensal bacteria from the human colon to essential oils. *Microbiology* **158**.
- Theilmann MC, Goh YJ, Nielsen KF, Klaenhammer TR, Barrangou R, Hachem MA. 2017. *Lactobacillus acidophilus* metabolizes dietary plant glucosides and externalizes their bioactive phytochemicals. *mBio* **8**.
- Vasconsuelo A, Boland R. 2007. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Science* **172**: 861–875.
- Valdivieso-Ugarte M, Gomez-Llorente C, Plaza-Díaz J, Gil Á. 2019. Antimicrobial, antioxidant, and immunomodulatory properties of essential oils: A systematic review. *Nutrients* **11** (11), 2786.
- Velíšek J. 2002. *Chemie potravin*, 1. díl. Osis, Tábor.
- Venkataraman B et al. 2021. nutrients Thymoquinone, a Dietary Bioactive Compound, Exerts Anti-Inflammatory Effects in Colitis by Stimulating Expression of the Colonic Epithelial PPAR- γ Transcription Factor. *Nutrients* **13**: 1343.
- Wink M. 2015. Modes of Action of Herbal Medicines and Plant Secondary Metabolites. *Medicines* **2**: 251-286.
- Woo, C. C., Kumar, A. P., Sethi, G., Tan, K. H. 2012. Thymoquinone: potential cure for inflammatory disorders and cancer. *Biochemical pharmacology*, **83**: 443–451.
- Xu J, Zhou F, Ji BP, Pei RS, Xu N. 2008. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology* **47**:174–179.

- Yan X, Xu Y, Shen C. 2023. Inactivation of *Staphylococcus aureus* by Levulinic Acid Plus Sodium Dodecyl Sulfate and their Antibacterial Mechanisms on *S. aureus* Biofilms by Transcriptomic Analysis. *Journal of Food Protection* **86**.
- Yang Y, Shah J, Klessig D F. 1997. Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes Dev* **11**.
- Zhang Y, Deng T, Sun L. 2021. Phylogenetic patterns suggest frequent multiple origins of secondary metabolites across the seed-plant “tree of life”. *National Science Review* **8**.
- Zhou F, Pichersky E. 2020. More is better: the diversity of terpene metabolism in plants. *Current Opinion in Plant Biology*. **55**: 1-10

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

DMSO – Dimethylsulfoxid

GIT = gastrointestinální trakt

HRAM = přesně určená hmota s ultravysokým rozlišením

ESI – elektrosprej

FID – flame ionization detector

Q–TOF = kvadrupól Time-of-Flight

MS = hmotnostní spektrometrie

RT = retenční čas

LC – kapalinová chromatografie

SFE – superkritická fluidní extrakce

SMR – sekundární metabolity rostlin

SSF – simultaneous saccharification and fermentation

SGF – simulated gastric fluid

UHPLC = ultravysokotlaká kapalinová chromatografie ve spojení

