

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality a bezpečnosti potravin



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Vliv mikrobiálních metabolitů rutinu na buněčné linie
Caco-2**

Diplomová práce

Bc. Nikola Součková

Výživa a potraviny

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

Konzultantka: Ing. Kateřina Tomisová

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv mikrobiálních metabolitů rutinu na buněčné linie Caco-2" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucí diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 20. 4. 2024

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Veronice Jarošové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky, které mi poskytovala při zpracování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat konzultance Ing. Kateřině Tomisové za její neustálou ochotu a trpělivost při konzultacích. A v neposlední řadě své rodině za podporu, kterou mi poskytovali během mého celého studia.

Vliv mikrobiálních metabolitů rutinu na buněčné linie Caco-2

Souhrn

Rutin je flavonoid rostlinného původu, který je považován za jednu z nejvýznamnějších fytochemikálií. Avšak jeho využití jakožto terapeutického činidla je limitováno jeho nízkou biodostupností a obtížnou vstřebatelností. Střevní mikrobiota ovlivňuje biologickou aktivitu rutinu a je zodpovědná za jeho potencionální zdravotní účinky. Rutin v tlustém střevě podléhá mikrobiálnímu metabolismu. Je přeměňován na fenolické kyseliny, jako je kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová (3,4-diOHPAA), 3-hydroxyfenyloctová (3-OHPAA), 3-(3-hydroxyfenyl) propionová (3-OHPPA), 4-hydroxyfenyloctová (4-OHPAA) a mnohé další. Každá z těchto sloučenin v organismu vykazuje odlišné biologické aktivity.

Praktická část diplomové práce je zaměřena na objasnění, jak rutin a jeho mikrobiální metabolity ovlivňují metabolismus buněk střevního epitelu. V rámci výzkumu byly inkubovány Caco-2 buněčné linie po dobu 24 hodin s rutinem, jeho mikrobiálními metabolity (3,4-diOHPAA, 3-OHPAA, 3-OHPPA, 4-OHPAA a kvercetin) a s jejich strukturně podobnými sloučeninami (kys. kávová a dihydrokávová). Vzorky buněčného média byly podrobeny analýze pomocí nukleární magnetické rezonance, která umožnila identifikovat metabolom buněčného média a stanovit koncentrace identifikovaných látek. Ty byly porovnány vůči kontrolnímu vzorku.

Výsledky výzkumu potvrzují, že rutin, mikrobiální metabolity rutinu a jim strukturně podobné látky mají vliv na metabolismus střevního epitelu. Ve vzorcích média Caco-2 buněčných linií bylo kvantifikováno celkem 31 metabolitů a u 18 z nich byly pozorovány statisticky významné změny v koncentracích v důsledku aplikace příslušných látek. Z mikrobiálních metabolitů rutinu měla největší vliv na metabolismus Caco-2 buněčné linie inkubace s kvercetinem a 3-OHPAA. O něco méně pak inkubace s 3,4-diOHPAA. V přítomnosti 3-OHPPA a 4-OHPAA nebyly zjištěny žádné statisticky významné změny v metabolismu Caco-2 buněk. Ze sloučenin strukturně podobných katabolitům rutinu měla největší účinek inkubace s kyselinou kávovou a o něco méně s kyselinou dihydrokávovou. U rutinu byl pozorován druhý nejnižší účinek v porovnání s ostatními aplikovanými katabolity, pokud nepočítáme 3-OHPPA a 4-OHPAA.

Klíčová slova: *In vitro*, metabolismus, metabolomika, střevní mikrobiom, Caco-2

Effect of microbial rutin metabolites to Caco-2 cell lines

Summary

Rutin is a flavonoid of plant origin that is considered one of the most important phytochemicals. However, the use of rutin as a therapeutic agent is limited by its low bioavailability and difficult absorption. The gut microbiota influences the biological activity of rutin and is responsible for its potential health effects. Rutin undergoes microbial metabolism in the colon. It is converted to phenolic acids such as 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (3,4-diOHPAA), 3-hydroxyphenylacetic acid (3-OHPAA), 3-(3-hydroxyphenyl) propionic acid (3-OHPPA), 4-hydroxyphenylacetic acid (4-OHPAA) and many others. Each of these compounds exhibits distinct biological activities in the body.

The practical part of the thesis aimed at elucidate how rutin and its microbial metabolites affect the metabolism of intestinal epithelial cells. As part of the research, Caco-2 cell lines were incubated for 24 hours with rutin, its microbial metabolites (3,4-diOHPAA, 3-OHPAA, 4-OHPAA and quercetin) and their structurally similar compounds (caffeic and dihydrocavic acids). The cell medium samples were subjected to nuclear magnetic resonance analysis to identify the metabolome of the cell medium and to determine the concentrations of the identified compounds. These were compared against the control sample.

Research results confirm that rutin, its microbial metabolites and their structural similarities affect the metabolism of the intestinal epithelium. A total of 31 metabolites were quantified in Caco-2 cell line media samples, and statistically significant changes in concentrations were observed for 18 of them as a result of the application of the respective substances. Of the microbial metabolites of rutin, incubation with quercetin and 3-OHPAA had the greatest effect on the metabolism of the Caco-2 cell line. Incubation with 3,4-diOHPAA was slightly less important. No statistically significant changes in the metabolism of Caco-2 cells were found in the presence of 3-OHPAA and 4-OHPAA. Of the compounds structurally similar to rutin catabolites, incubation with caffeic acid had the greatest effect and slightly less with dihydrocaffeic acid. Rutin was observed to have the second lowest effect compared to other applied, except 3-OHPPA and 4-OHPAA.

Keywords: *In vitro*, metabolism, metabolomics, gut microbiome, Caco-2

Obsah

1	Úvod	8
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	9
3	Literární rešerše	10
3.1	Rutin	10
3.1.1	Zdroje a biologická dostupnost	11
3.1.2	Extrakce rutinu	12
3.1.3	Biologická aktivita	13
3.2	<i>In vitro</i> trávící modely	14
3.3	Metabolismus rutinu v trávícím traktu	15
3.4	Buněčné kultury	16
3.4.1	Caco-2 buněčná linie	17
3.5	Střevní mikrobiom	18
3.5.1	Vliv polyfenolů na mikrobiální rozmanitost	20
3.6	Metabolomika	21
3.6.1	Metabolická dysregulace	21
3.6.2	Mikrobiální metabolomika	22
3.6.3	Analytické metody v metabolomice	23
3.6.3.1	Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií	24
3.6.3.2	Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií	25
3.6.3.3	Kapilární elektroforéza s hmotnostní spektrometrií	26
3.6.3.4	NMR	27
3.7	Využití NMR	29
4	Metodika	30
4.1	Buněčné kultury	30
4.2	Hodnocení cytotoxicity	30
4.3	Metabolomický experiment na Caco-2 buněčné linii	31
4.4	Příprava vzorků média	31
4.5	Příprava vzorků pro NMR analýzu	31
4.6	¹H NMR spektrometrie	32
4.7	Zpracování spekter	32
4.8	Statistické vyhodnocení	32
5	Výsledky	33
6	Diskuze	38
7	Závěr	41
8	Literatura	42
9	Seznam použitých zkratk a symbolů	63

1 Úvod

Polyfenoly jsou sekundární metabolity rostlin, které jsou nedílnou součástí lidské stravy. Nacházejí se v široké škále konzumovaného ovoce, zeleniny a produktů rostlinného původu. V současné době je známo přibližně 8 000 různých polyfenolů (Santhakumar et al. 2018). Ty se obecně dělí do dvou hlavních skupin na flavonoidy a neflavonoidy. Flavonoidy se dále člení dle C-heterocyklu na flavonoly, flavony, flavan-3-oly, isoflavony, flavanony, dihydroflavonoly, antokyanidiny a chalkony. Mezi neflavonoidní fenolické látky patří fenolové kyseliny, dále taniny a stilbeny.

V posledních letech byly prospěšné účinky polyfenolů intenzivně zkoumány. V experimentech *in vitro*, *ex vivo* a v testech na zvířatech byla zejména u flavonoidů prokázána řada prospěšných účinků. Uvádí se, že polyfenoly jsou vhodným nutraceutikem proti chorobám, jako jsou kardiovaskulární, nádorová, neurodegenerativní onemocnění a diabetes mellitus (Stromsnes et al. 2021). Zdravotní účinky těchto sloučenin jsou ovšem do značné míry dány jejich biologickou dostupností. Aby se polyfenoly staly biologicky dostupné, podléhají ve střevě mikrobiálnímu metabolizmu a jsou přeměňovány na sekundární metabolity. Studium jejich účinků je však často opomíjeno, jelikož se většina studií zaměřuje pouze na primární sloučeniny. Přitom vzniklé mikrobiální metabolity bývají v některých případech ještě biologicky dostupnější a účinnější než původní polyfenoly (Gade & Kumar 2023). Ačkoliv dochází k pokroku v porozumění interakcí mezi polyfenoly a střevní mikrobiotou, většina výzkumu je stále nedostatečná. Převážně účinky mikrobiálních metabolitů jsou z velké části stále neprobádány. Pro lepší porozumění jejich mechanismům účinku je třeba se zaměřit na další výzkum metabolismu jednotlivých polyfenolů.

Bylo prokázáno, že buněčná linie Caco-2, odvozená z karcinomu tlustého střeva je vhodným modelem pro studium střevní absorpce a metabolismu látek (Gan et al. 1994). Ve srovnání se zvířecími modely jsou buněčné linie jednoduché, časově nenáročné, cenově přijatelné a poskytují spolehlivé a reprodukovatelné výsledky. Oblíbenost této buněčné linie je dána zejména využitím v mnoha vědeckých disciplínách.

Identifikací a kvantifikací metabolitů, a to včetně těch mikrobiálních, se zabývá vědní disciplína zvaná metabolomika. Její použití je v posledních letech na vzestupu. Uplatnění nachází v mnoha oblastech, včetně systémové biologie, lékařství, farmacie, zemědělství a potravinářství. Identifikaci metabolitů v metabolomice zajišťuje nukleární magnetická rezonance a analytické metody jako je: plynová chromatografie, kapalinová chromatografie a kapilární elektroforéza, které se nejčastěji využívají ve spojení s hmotnostní spektrometrií (Shulaev 2006). Při výběru metody je nutné počítat s tím, že každá má své výhody a nevýhody. Zároveň každá z těchto metod je vhodná pro jiný způsob využití.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem teoretické části diplomové práce je zpracování literární rešerše zaměřené na metabolomiku, přeměny rutinu v trávicím traktu člověka a *in vitro* buněčné modely. Cílem praktické části je zjistit, jak mikrobiální metabolity rutinu ovlivňují metabolismus buněk střevního epitelu.

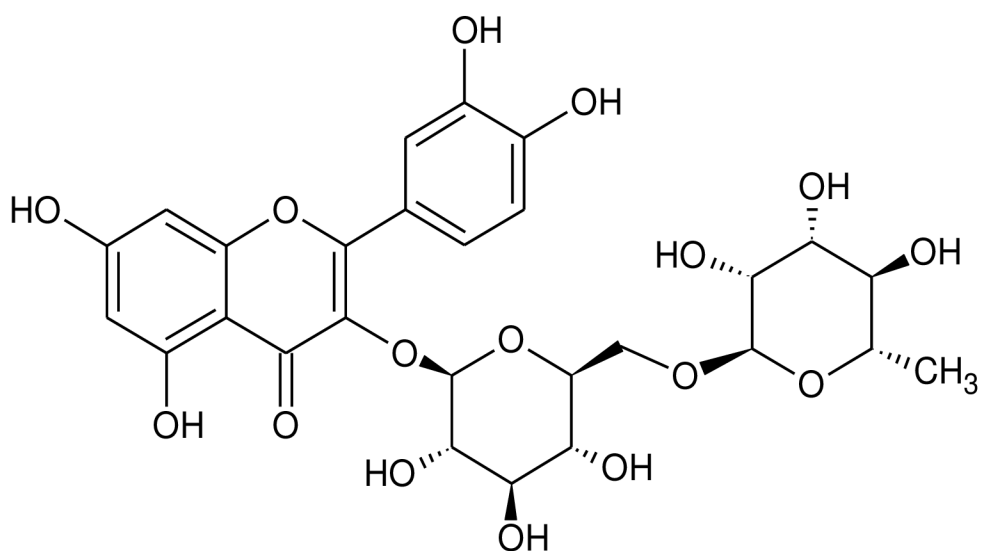
Hypotéza:

Aplikace mikrobiálních metabolitů rutinu ovlivní metabolismus střevních epiteliálních buněk v *in vitro* buněčném modelu.

3 Literární rešerše

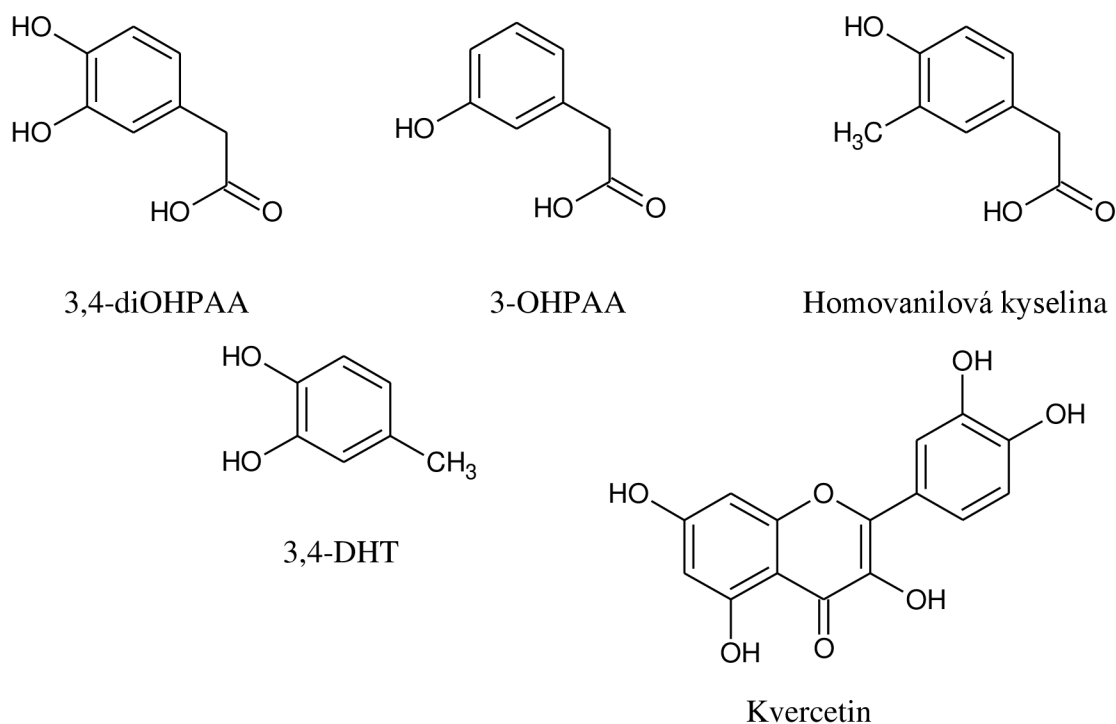
3.1 Rutin

Rutin (obr. 1) neboli 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavon-3-rhamnoglukosid je klasifikován jako flavonoid flavonového typu (Hosseinzadeh & Nassiri-Asl 2014). Jedná se o glykosid, který se běžně vyskytuje jako sekundární metabolit rostlin (Semwal et al. 2021). Zahrnuje aglykonovou formu kvercetin, která je vázána v poloze C-3 na molekulu rutinovy. Ta je složena z jedné molekuly glukosy a molekuly rhamnosy (Aherne & O'Brien 2002). V potravinových doplňcích se rutin často vyskytuje ve formě žlutého prášku, jehož molární hmotnost je 610,521 g/mol. Vyznačuje se nízkou rozpustností ve vodě. Naopak velmi dobrá rozpustnost byla zaznamenána v pyridinu (Semwal et al. 2021).



Obrázek č. 1: Vzorec rutin

Rutin může být dále označován jako soforin, rutinoid, kvercetin-3-*O*-rutinoid nebo také vitamin P (Semwal et al. 2021). Mezi některé jeho perorální metabolity (obr. 2) patří kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová (3,4-diOHPAA), 3,4-dihydroxytoluen (3,4-DHT), kyselina 3-methoxy-4-hydroxyfenyloctová (homovanilová kyselina), *m*-hydroxyfenyloctová (*m*-OHPAA) a 3,5,7, 3',5'-pentahydroxyflavonol (kvercetin) (Cervantes-Laurean et al. 2006).



Obrázek č. 2: Vzorce některých metabolitů rutinu

3.1.1 Zdroje a biologická dostupnost

Rutin se vyskytuje ve velkém množství rostlin. Nicméně pouze v omezeném počtu z nich je rutin jednou z hlavních složek. Jeho významné zastoupení bylo shledáno například u kosmatcovníku jedlého (*Carpobrotus edulis*), routy vonné (*Ruta graveolens*), pohanky obecné (*Fagopyrum esculentum*), pomerančovníku čínského (*Citrus sinensis*), jabloně domácí (*Malus domestica*), fíkovníku smokvoň (*Ficus carica*) a u jerlínu japonského (*Sophora japonica*) (Semwal et al. 2021). Dále je rutin zastoupen například v rajčatech, meruňkách, rebarboře, celeru, špenátu a čaji (Hosseinzadeh & Nassiri-Asl 2014).

Rutin je velmi ceněn díky svým biologickým účinkům. Nicméně kvůli přítomnosti benzenového kruhu a hydroxylové skupiny ve stejné molekule je špatně rozpustný ve vodě. To omezuje jeho přímou použitelnost ve farmaceutickém průmyslu, potravinách a kosmetických výrobcích. Dále rutin vykazuje špatnou skladovatelnost, nekontrolované uvolňování, nestabilitu při trávení v gastrointestinálním traktu a nízkou biologickou dostupnost (Tobar-Delgado et al. 2023).

Studie Wu et al. (2011a) uvádí, že za špatnou biologickou dostupnost přírodních polyfenolů jsou zodpovědné střevní metabolické enzymy, transportéry a mikrobiota. Dále je ovlivněna výše zmíněnou rozpustností ve vodě (Tobar-Delgado et al. 2023). Výzkum provedený Pedriali et al. (2008) ukázal, že jedna z možností, jak zlepšit rozpustnost rutinu spočívá v navázání karboxylátové skupiny na cukernou část. V posledních letech byly navrženy ještě další možnosti zlepšující farmakokinetické vlastnosti rutinu. Mezi které patří zapouzdření rutinu do lipozomů (Bonechi et al. 2018), polymerních micel (Ibrahim et al. 2023), různých nosičů (Konecsni et al. 2012, Babazadeh et al. 2016) a nanočástic (Negahdari et al. 2021).

Ve studii Park et al. (2013) například vytvořili ceramidový lipozom v celulosovém hydrogelu, který měl následně usnadnit vstřebávání rutinu a kvercetinů kůží. Potvrdili tak svou myšlenku, že komplex lipozom/hydrogel může být nosičem léčiva a zajistit vstřebávání ve vodě nerozpustných antioxidantů. Studie Babazadeh et al. (2016) zkoumala zapouzdření rutinu nanostrukturovanými lipidovými nosiči rutinu pro následnou možnost fortifikace a vytvoření nových funkčních potravin. Při jejich použití nebyly shledány žádné nepříznivé vlivy na výsledný produkt. Další možností je využití submikronových částic chitosanu (CH)-tripolyfosfátu (TPP) jako nosičů rutinu. Jeho uvolňovací schopnosti byly studovány v simulovaných žaludečních šťávách a tekutinách tenkého střeva. Částice vykazovaly dostatečnou velikost pro efektivní střevní absorpci a byly schopny uvolnit svůj obsah rutinu v simulovaných střevních podmínkách (Konecni et al. 2012). Studie Wu et al. (2020) zase zkoumala užití nanočástic stříbra obsahujících rutin při antitrombotické léčbě. Kombinací nanočástic stříbra (AgNP) a rutinu bylo dosaženo cíleného zvýšení rozpustnosti, stability a postupného uvolňování rutinu.

3.1.2 Extrakce rutinu

Vzhledem k oblibě rutinu je pozornost zaměřena i na způsoby jeho získávání. Stejně jako u jiných biologicky aktivních sloučenin se nejčastěji používá extrakce. Ovšem její konvenční způsob často postrádá účinnost kvůli nízkému výtěžku, ztrátě některých sloučenin, užití velkého množství rozpouštědel, nízké specifčnosti a nutnosti udržování vysoké teploty po dobu extrakce (Chahyadi & Elfahmi 2020).

V poslední době jsou kromě tradiční extrakce rozpouštědlem užívány i modernější metody, jako je extrakce tlakovou tekutinou (Zhang et al. 2008), superkritickou tekutinou (Dimitrieska-Stojković & Zdravkovski 2003), extrakce za použití mikrovln (Zhang et al. 2009), extrakce v pevné fázi (Michalkiewicz et al. 2008) a ultrazvukem asistovaná extrakce (Yang & Zhang 2008). Každá z těchto metod má svá omezení i výhody. Zároveň každá vykazuje jinou výtěžnost rutinu (Chua 2013).

Jako jeden z hlavních zdrojů rutinu se uvádí pohanka, která tento flavonoid nerovnoměrně obsahuje jak ve stonku, listech, květech, tak i v semenech (Kreft et al 1999). Množství rutinu vyskytující se v jednotlivých částech je dáno do jisté míry jejím rostlinným druhem (Kalinová & Dadakova 2004) a pohybuje se mezi 3-6 % sušiny rostliny (Campbell 1997). Nejvyšší obsah rutinu byl zaznamenán u pohanky tatarské (*Fagopyrum tataricum*), která vykazuje několikanásobně vyšší obsah rutinu ve všech částech rostliny v porovnání s pohankou obecnou (*Fagopyrum esculentum*) (Park et al. 2004). Uvádí se, že rostlin obsahujících rutin je více než 70 druhů (Chua 2013), přičemž izolovat se jej podařilo například i z tabákových listů v množství 1,5 % sušiny rostliny (Faithi et al. 2006).

3.1.3 Biologická aktivita

Rutin byl poprvé objeven již v 19. století (Frutos et al. 2019). Od té doby je podrobován neustálému výzkumu. Bylo zjištěno, že má výborné antioxidační vlastnosti, jelikož dokáže vázat volné radikály a kovové ionty (Mamani-Matsuda et al. 2006). Jeho jedinečnou schopností je chelatovat ionty železa, které jsou zodpovědné právě za tvorbu volných radikálů kyslíku (Valério et al. 2009). Tím zabraňuje tvorbě zánětlivých cytokinových transkripčních faktorů a pomáhá při léčbě chronických zánětlivých onemocnění (Inal et al. 2002).

Zároveň vykazuje protizánětlivé (Selloum et al. 2003), antiproliferativní (Santos et al. 2011), antidiabetické (Ghorbani 2017), antitrombotické (Sheu et al. 2004) a kardioprotektivní účinky (Ziaee et al. 2009). Studie Chen et al. (2013) dokonce uvedla, že rutin je schopen snížit růst nádoru prostřednictvím zastavení buněčného cyklu a indukce apoptózy nádorových buněk. Protinádorový účinek rutinu potvrzuje též studie Caparica et al. (2020), jež hodnotila účinky rutinu na buněčnou linii renálního karcinomu (786-O). Některé studie uvádí, že mechanismus farmakologického působení rutinu je dán útlumem prozánětlivých cytokinů, zesílením antioxidační enzymové aktivity a regulací apoptických biomarkerů, jež následně vedou k výše zmíněným účinkům (Enogieru et al. 2018, Ganeshpurkar & Saluja 2017).

Dále bylo zjištěno, že rutin dokáže významně ovlivnit hladinu kadmia v mozku a plazmě u potkanů vystavených kadmii a zlepšit tak jejich kognitivní funkce. Výsledky ukázaly, že podávání rutinu vedlo ke snížení aktivity cholinesterázy a hladiny markerů oxidačního stresu, které byly zvýšeny v důsledku vystavení organismu kadmii (Oboh et al. 2020). V posledních letech se využívá terapeutických účinků rutinu i při léčbě mužské neplodnosti. Uvádí se, že rutin dokáže ovlivnit dysfunkci varlat zmírněním indukovaného oxidačního stresu, inhibicí apoptózy, zánětu a ovlivnit další fyziologické faktory související s dysfunkcí (Rotimi et al. 2023). Terapeutické účinky rutinu byly zkoumány dále při léčbě diabetu mellitu. Ve studii Chielle et al. (2016) bylo experimentálním zvířatům podáváno 100 mg/kg rutinu po dobu 30 dnů. Bylo prokázáno, že příjem rutinu vede ke snížení hladiny glukosy a LDL cholesterolu v krvi. Ve studii Ganesan et al. (2020) u alloxanem vyvolaných diabetických potkanů bylo zase shledáno, že podávání rutinu v dávce 100 mg/kg orálně po dobu 28 dnů dokáže snížit hladinu močoviny, kreatininu, triglyceridů a cholesterolu a zabránit tak tvorbě ketolátek v moči. Zároveň se uvádí, že rutin dokáže chránit před diabetickou acidózou a fibrózou prostřednictvím zlepšení exprese genů (AQP2, AQP3 a V2R).

Studie Ravi et al. (2018) tvrdí, že je třeba suplementovat 500 mg dvakrát denně, aby rutin mohl takto příznivě působit na organismus člověka. Zdroje uvádějící denní příjem rutinu ze stravy jsou omezené. Avšak studie Kimira et al. (1998) z Japonska odhadla denní příjem svých dobrovolníků na 1,5 mg.

Vyhodnocování toxicity je zásadním požadavkem při posuzování chemických látek či léčiv. Akutní a chronická toxicita rutinu byla hodnocena již v roce 1947 testováním na zvířatech. U experimentálních zvířat nebyly shledány žádné toxické příznaky, ani při podávání rutinu nitrožilně a intraperitoneálně v dávkách 30–50 mg/kg (morče, potkan) a intravenózně 100–200 mg/kg (králík) pro hodnocení akutní toxicity. V případě chronické toxicity byla experimentálním zvířatům podávána strava s 1 % rutinu po dobu 400 dnů.

Po ukončení experimentu nebyla v histopatologii orgánů pozorována žádná poškození tkání (Wilson et al. 1947). Jiná, novější studie odhalila při výzkumu na zvířatech, že rutin je netoxický až do 5 000 mg/kg (Suzuki et al. 2015).

3.2 *In vitro* trávicí modely

Trávicí modely *in vitro* začaly být využívány od začátku 90. let 20. století zejména při studiu procesu trávení potravin (Ferrua & Singh 2010). Jedná se o modely, se kterými se pracuje v podmínkách laboratoře a výzkum probíhá tzv. „ve skle“ nebo také „ve zkumavce“ (Boyuklieva et al. 2023). Představují vhodnou alternativu k *in vivo* modelům, které využívají pro svůj výzkum zvířat či lidí. Ačkoliv *in vivo* modely poskytují přesnější výsledky, jejich užití je náročné časově a finančně. Zároveň jsou modely *in vitro* upřednostňovány z důvodu etického (Kong & Singh 2008). V současné době existuje mnoho různých *in vitro* trávicích modelů. Výběr konkrétního modelu je dán typem výzkumu a předmětem zkoumání (Alminger et al. 2014). Jedním z primárních způsobů, jak třídit tyto modely je jejich rozdělení na modely statické a dynamické (Kong & Singh 2008).

Statické trávicí modely jsou koncipovány k simulaci procesů lidského trávení, využívající skleněné nádoby. Jejich užití ovšem nedokáže dostatečně nasimulovat podmínky, kterým potravina čelí v trávicím traktu. I přes tuto skutečnost mohou být modely statické modely praktické. Jejich výhodou je, že jsou levné a proveditelné u velkého množství vzorků (Sensoy 2021). Nicméně při trávení se musí brát v potaz poměr enzym-substrát, pH a transport produktů natrávené potravy. Z tohoto důvodu jsou statické modely značně limitované, jelikož tyto parametry nelze během procesu trávení upravovat. Následkem toho nelze přesně vyhodnotit transformaci potravin během trávení a lze pouze omezeně predikovat dostupnost živin. Tato značná omezení lze kompenzovat využitím dynamických systémů, které dokáží lépe nasimulovat podmínky lidského trávicího traktu a zajistit vhodnější reprodukovatelnost pro vědecké studie (Dupont et al. 2019). Jejich výhodou je, že mohou samostatně napodobovat změnu pH, sekreci enzymů, peristaltické síly a mikrobiální fermentaci (Liu et al. 2019).

Dynamické systémy se dále dělí na modely monokompartmentové a multikompartmentové. Monokompartmentové systémy zahrnují dynamický model žaludku (DGM), simulátor lidského žaludku (HGS), simulátor trávení žaludku (GDS), mechanický žaludeční systém *in vitro* (IMGS) a model umělého tlustého střeva (ARCOL). Zatímco mezi multikompartmentové neboli vícekomorové systémy se řadí dynamický gastrointestinální digestor (DIDGI), TNO gastrointestinální model (TIM), simulátor lidského střevního mikrobiálního ekosystému (SHIME), simulátor gastrointestinálního traktu (SIMGI), upravený žaludek a model tenkého střeva (ESIN) (Ji et al. 2022).

Pro studium střevního mikrobiomu a jeho vlivu na trávení potravy a vstřebávání živin bylo v posledních desetiletích vytvořeno několik modelů střevní fermentace *in vitro* (Guerra et al. 2012). Mezi ně patří například model vsádkové fermentace, PolyFermS, MiniBio, TSI, TIM-2 a některé již výše uvedené jako je SHIME a SIMGI (Nissen et al. 2020). Tyto modely napodobují lidské trávení potravin nebo jejich jednotlivých složek (Guerra et al. 2012). Zároveň umožňují porozumět faktorům ovlivňujících střevní mikrobiom. Mezi ně patří například dietní sloučeniny, mikrobiální patogeny, bioaktivní látky, léčiva a toxické látky.

Principem těchto modelů je kultivace střevních mikroorganismů člověka za přesně daných podmínek a následné studium mikrobiálního metabolismu v průběhu času. Pro co nejpřesnější napodobení ekosystému tlustého střeva se často využívá fekálního inokula od zdravých či nemocných dárců (Nissen et al. 2020).

Právě *in vitro* modely napomáhají při studiu mechanismů metabolismu sloučenin získaných z potravy, což přispívá k porozumění jejich metabolických drah a biochemických procesů v organismu.

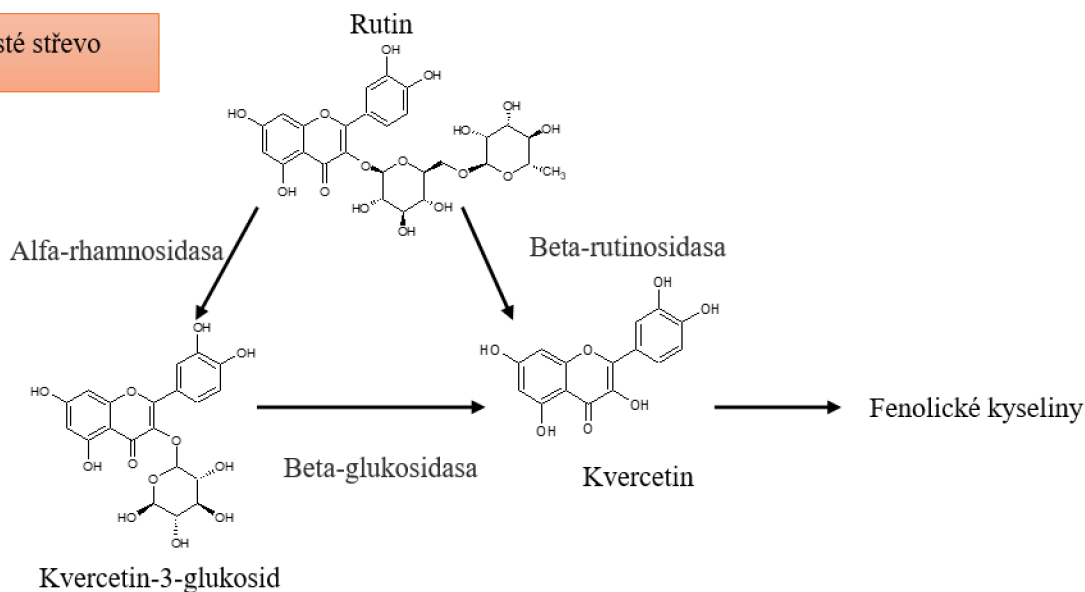
3.3 Metabolismus rutinu v trávicím traktu

Trávicí trakt tvoří skupina orgánů, která má za úkol rozkládat potravu a získávat z ní živiny nezbytné pro organismus. Začíná v dutině ústní. Dále zahrnuje hltan, jícen, žaludek, tenké střevo, tlusté střevo a řitní otvor. Během procesu příjmu potravy dochází k mechanickému a chemickému zpracování, vstřebávání živin a vyloučení nestravitelných zbytků (Sensoy 2021).

Rutin se dostává do organismu rostlinnou potravou (Manach et al. 1997). A vzhledem k tomu, že nedokáže být dostatečně absorbován, přesouvá se jeho velká část v nezměněné formě až do tlustého střeva. Zde je působením mikrobiálních glykosidas rozkládán (Kim et al. 2005). Přesněji střevní bakterie tlustého střeva zhydrolyzují rutin, odstraní cukernou část a usnadní tak vstřebávání aglykonu (Amaretti et al. 2015).

Dle výzkumu Riva et al. (2020) vyplývá, že střevní bakterie, které mají schopnost metabolizovat rutin obsahují enzym alfa-rhamnosidasu nebo beta-glukosidasu. Díky nim mohou postupně přeměnit rutin na kvercetin-3-glukosid a kvercetin-3-glukosid na kvercetin (obr. 3). Přímou přeměnu rutinu na kvercetin umožňuje enzym beta-rutinosidasu (Nam et al. 2012). Alfa-rhamnosidasu byly nalezeny například u *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* (Beekwilder et al. 2009) a *Bifidobacterium dentium* (Bang et al. 2015). Dále bylo zjištěno, že rutin může být degradován také například pomocí *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides uniformis* a *Parabacteroides distasonis* (Bokkenheuser et al. 1987). *Eubacterium ramulus* a *Enterococcus casseliflavus* jsou zodpovědné za konverzi kvercetin-3-glukosidu na kvercetin (Schneider et al. 1999). Beta-glukosidasu byla zjištěna i u bakterií, které zaujímají většinovou část lidské střevní mikrobioty. Mezi ně patří *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium longum*, *Enterococcus faecalis*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides uniformis*, *Parabacteroides distasonis* a *Escherichia coli* (Schloissnig et al. 2013). Studie Braune & Blaut (2016) shrnula, že schopnost odštěpovat glukosovou skupinu mají *Bifidobacteriaceae* (přesněji 10 druhů *Bifidobacterium*) a ve většině případů se vyskytují i u *Lactobacillaceae* (5 druhů *Lactobacillus*), *Lachnospiraceae* (4 druhy) a *Enterococcaceae* (4 druhy *Enterococcus*). O výskytu beta-rutinosidasu u mikroorganismů neexistuje dostatečné množství informací. Nicméně se jí podařilo izolovat například z pohanky obecné (Baumgartel et al. 2003).

Trusté střevo



Obrázek č. 3: Schématické znázornění degradace rutinu (upraveno dle: Riva et al. 2020)

Po hydrolyzaci aglykonu kvercetinů vznikají následně další produkty jako je kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová (3,4-diOHPAA), 3-hydroxyfenyloctová (3-OHPAA), 3-(3-hydroxyfenyl) propionová (3-OHPPA) a 3-(3,4-dihydroxyfenyl) propionová (3,4-diOHPPA) (Havlik et al. 2020).

Za použití prasečího slepého střeva bylo zjištěno, že se kvercetin dále metabolizuje na floroglucinol a 3,4-dihydroxytoluen (Labib et al. 2004). Zatímco studie využívající anaerobní bakterii *Eubacterium ramulus* zjistila, že jako meziproducty při konverzi kvercetinů na 3,4-diOHPAA vzniká alphononin a taxifolin (Braune et al. 2001).

3.4 Buněčné kultury

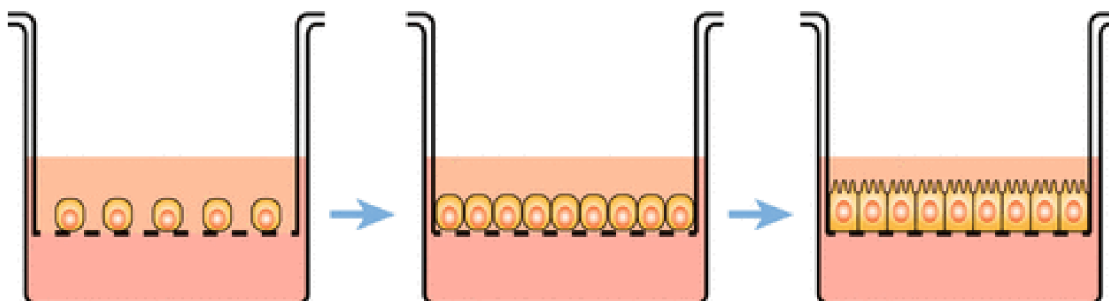
Buněčná kultura je systém, ve kterém jsou eukaryotické, prokaryotické nebo rostlinné buňky *in vitro* kultivovány za vhodných fyziologických podmínek (včetně média, vhodné teploty a pH). Její užití má mnoho výhod, mezi které patří snadná manipulace, dobrá dostupnost a reprodukovatelnost dat získaných při výzkumu na buněčných kulturách (Zhao 2023). Pro kultivaci *in vitro* se využívají primární kultury nebo trvalé buněčné linie (Schaeffer 1979).

Primární kultury vznikají z primárních buněk, které se získávají přímo z tkání. Primární buňky mohou být 2 typů: adherentní a suspenzní. Adherentní buňky se při kultivaci přichytávají na povrch kultivační baňky a dále rostou v monovrstvě. Uvádí se, že tyto buňky jsou zpravidla získávány z tkání orgánů. Suspenzní buňky jsou buňky, které jsou volně v kultivačním médiu a na povrch kultivační baňky se nepřichytávají. Většina těchto buněk je získávána z krevního řečiště. Primární kultury nachází využití zejména při vývoji vakcín, léčiv, ve virologii, genovém inženýrství a výzkumu nádorových onemocnění. Nicméně jejich limitním faktorem je krátká životnost, která je dána replikativním stárnutím (Zhao 2023).

Buněčnou linií je označována trvale zavedená buněčná kultura, které byla získána pasážováním a nyní je schopna neomezeného množení (Masters 2000). Její využití je snadné, levné a poskytuje neomezený přísun materiálu (Kaur & Dufour 2012). Buněčná linie získaná z tkáně, která je zasažena onemocněním, může pomoci při odhalování patologických jevů, které by jinak nemohly být identifikovány. Zejména nádorové buněčné linie jsou často užívanými ve studiu nádorového onemocnění (Monks et al. 1991). Dále se buněčné linie využívají při testování metabolismu léků a cytotoxicity (Steinbrecht et al. 2019), při vývoji vakcín (Genzel 2015), produkci protilátek (Kunert & Reinhart 2016) a tvorbě umělých tkání (např. umělé kůže) (Schurr et al. 2009). I přes všechny výhody je třeba s buněčnou linií pracovat opatrně. Ačkoliv by měla mít všechny funkční vlastnosti podobné primárním buňkám, může se stát, že buněčná linie změní fenotyp buněk, jejich přirozenou funkci nebo schopnost reagovat na podmínky kvůli genetické manipulaci (Kaur & Dufour 2012).

3.4.1 Caco-2 buněčná linie

Buňky Caco-2 pocházejí z lidského kolorektálního adenokarcinomu. Tato buněčná linie byla založena Jorgenem Foghem ve Sloan Kettering výzkumném institutu nádorového onemocnění (Fogh et al. 1977). Při kultivaci ve vhodném médiu buněčná linie diferencuje (obr. 4). Diferenciace začíná zpravidla po 7 dnech kultivace a je dokončena po 21 dnech. Diferencované monovrstvy Caco-2 slouží k simulaci střev *in vitro*, zatímco buňky, jež nebyly ponechány řádně diferenciaci jsou využívány pro analýzu antioxidačních a protinádorových aktivit aktivních látek. (Ding et al. 2021).



Obrázek 4: Diferenciace Caco-2 buněk na kultivačním médiu (Lea 2015).

Caco-2 buňky, které jsou kultivované na propustném filtru, mají podobné morfologické a funkční vlastnosti jako enterocyty (Panse & Gerck 2022). Jejich povrch je pokryt mikroklky a mají stejnou absorpci, metabolismus a schopnost vylučování léčiva (Murota et al. 2000). Produkují také enzymy kartáčového lemu jako jsou sacharasa-isomaltasa (Fleet et al. 2003) a alkalická fosfatasa placentárního typu (Souleimani & Asselin 1993). Transportní mechanismus v Caco-2 buňkách zajišťují různé transportéry. Nicméně nejdůležitější jsou P-glykoprotein (P-gp) a multirezistentní proteiny (MRP) (Gutmann et al. 1999). P-gp a MRP patří do superrodiny transportérů ATP-binding cassette (ABC). Přesto MRP vykazují jinou substrátovou specifitu a mohou být zodpovědné za rezistenci vůči léčivům (Marquez & van

Bambeke 2011). Buňky také disponují cytochromem P450 a UDP-glukuronsyltransferasou, které se podílejí na metabolizaci léků (Lampen et al. 2004).

Studie Zhang et al. (2013) zkoumala absorpční a metabolické aktivity rutinů v Caco-2 buňkách. Pozorována byla částečná metabolizace rutinů na glukuronidovaný rutin a zároveň byl sledován transport rutinů a jeho glukuronidovaného metabolitu v apikálním až bazolaterálním směru a opačně. Rutin a glukuronidovaný rutin měly rozdílnou vstřebatelnost přes apikální a bazolaterální membránu. U rutinů byl zaznamenán větší transport z bazolaterálního směru do apikálního, zatímco u glukuronidovaného rutinů byla rozdílná rychlost přestupu v obou směrech. Na transportu a intracelulární akumulaci se podílely P-gp a MRP. Tyto informace jsou důležité zejména při inovaci léků s vysokou vstřebatelností.

I přes veškerou podobnost s normálním střevním epitelem bylo u Caco-2 buněčné linie nalezeno několik omezení. Běžný střevní epitel zdaleka neobsahuje jen jeden typ buněk, zatímco u Caco-2 buněk jsou přítomné pouze enterocyty. Zároveň Caco-2 buňky nezajišťují produkci hlenu, který je charakteristický pro střevní sliznici (Lea 2015). Hlen ve střevní sliznici plní ochrannou funkci a slouží jako bariéra pro určité léky, transportní systémy a je nepropustný pro většinu bakterií a toxinů (Macedo et al. 2021). Dále se na Caco-2 buněčném modelu nevyskytují nebuněčné látky jako například fosfolipidy a žlučové kyseliny (Lea 2015). Z důvodu těchto odlišností a co největšího nasimulování buněk tenkého střeva byly navrženy modely kokultury Caco-2 buněk a HT29-MTX. Jedná se o pohárkové buňky, které jsou schopné produkce hlenu (Reale et al. 2021). Zároveň buňky HT29 snižují těsnost, čímž je zvýšena paracelulární transportní cesta (transport látek přes mezibuněčné prostory buněk) (Chen et al. 2010). Tento model je mimo jiné často využíván při studiu transportu (Strugari et al. 2018), adheze patogenních bakterií (Dostal et al. 2014) a interakcí nanočástic (Akbari et al. 2017).

3.5 Střevní mikrobiom

Střevním mikrobiomem je označován souhrn mikroorganismů, bakterií, virů, prvoků, hub a genetického materiálu, který je přítomen v gastrointestinálním traktu savců (Cresci & Izzo 2019). Uvádí se, že lidský střevní mikrobiom dospělého člověka obsahuje $3,8 \times 10^{13}$ různých mikroorganismů a naprostá většina se nachází v tlustém střevě (Sender et al. 2016). Střevní mikrobiom každého z nás je osídlen minimálně 160 druhy z celkových 1150 odhadovaných bakteriálních druhů (Qin et al. 2010), přičemž je složen převážně z 5 hlavních kmenů. Radíme mezi ně kmeny Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria a Verrucomicrobia – kmeny Bacteroidetes a Firmicutes dokonce tvoří více než 90 % bakterií (Arumugam et al. 2011).

Střevní mikrobiom se formuje již od narození a jeho složení se v průběhu života mění. V úplně nejranějším stadiu života je střevní mikrobiom ovlivněn způsobem porodu. Při něm dochází ke kolonizaci mikrobiomu novorozence v závislosti na tom, s jakou mikrobiotou se novorozenec setkal během porodu. V případě vaginálního porodu dítě přejímá vaginální mikrobiotu, ovšem v případě císařského řezu se novorozenec dostává do kontaktu s kožní mikrobiotou (Clemente et al. 2012). Děti narozené vaginálně mají následně vyšší kolonizaci kmenem Bacteroidetes v porovnání s dětmi narozenými císařským řezem (Jakobsson et al.

2014). Bylo zjištěno, že existuje také různé mikrobiální zastoupení u dětí kojených a krmených dětskou výživou. U dětí, které byly krmeny mateřským mlékem bylo pozorováno vyšší zastoupení bifidobakterií oproti dětem krmených umělou výživou (Balmer & Wharton 1989). Bifidobakterie zvyšují hladinu imunoglobulinu A, který dokáže vázat patogeny ve střevě a vyloučit je bez vyvolání zánětlivé reakce (Ouwehand et al. 2002). Složení střevní mikrobioty je z velké části ovlivněno stravou. Děti přijímající pouze umělou výživu a mateřskou výživu mají střevní mikrobiom uzpůsobený pro lepší využití laktátu a jejich mikrobiom není nijak zvlášť diverzifikován (Salazar et al. 2014). S přechodem na pevnou stravu se mění složení střevní mikrobioty, kde dříve dominoval rod *Bifidobacterium* a postupně se mění na mikrobiotu dospělého jedince s dominujícími kmeny Bacteroidetes a Firmicutes (Koenig et al. 2011).

Mikrobiální rozmanitost je dále ovlivněna v závislosti na geografickém původu a etnicitě. Studie Yatsunenka et al. (2012) zkoumala stolicí 531 jedinců a sledovala genový obsah jejich mikrobiomů. Kohorta zahrnovala jedince od kojenců až po dospělé z Amazonie, Malawi a USA. Mikrobiální diverzita byla rostoucí s věkem ve všech oblastech, přičemž při porovnání diverzity mezi dospělými jedinci měli obyvatelé USA nejmenší variabilitu. Jak se ukázalo, strava se zdá být faktorem, který nejvíce ovlivňuje střevním mikrobiom. Příjem ovoce, zeleniny, vlákniny a pestrý jídelníček je zodpovědný za dostatečně diverzifikovaný mikrobiom. Na druhou stranu západní strava, která je bohatá na cukry, tuky a živočišné bílkoviny je jeho pravým opakem (Cresci & Bawden 2015). Při rostlinné stravě jsou pozorovány vyšší počty *Bacteroides* a Firmicutes, u diet s vysokým obsahem vlákniny jsou vysoké počty *Prevotelly*. Dále strava bohatá na živočišné bílkoviny a tuky je spojena s vysokým zastoupením *Bacteroides* (Wu et al. 2011b, David et al. 2014).

Negativně střevní mikrobiom ovlivňují antibiotika. Jejich užití je primárně zaměřeno na patogenní mikroorganismy, nicméně jsou zasaženy i příbuzné mikrobiální kmeny. Mikrobiota je následně negativně ovlivněna i po doužívání antibiotik (Jernberg et al. 2007). Následkem toho vzniká dysbióza a jedinec může být náchylný k nemoci (Cresci & Bawden 2015).

Studie ukazují, že jedinci trpící systémovými onemocněními mají odlišné mikrobiální osídlení a liší se v metabolických procesech ve střevě. To se týká například diabetu mellitu (Larsen et al. 2010), artritidy (Scher et al. 2015), aterosklerózy (Jie et al. 2017) a obezity (Santacruz et al. 2010). Studie Larsen et al. (2010) uvádí, že diabetičtí pacienti mají vyšší zastoupení Bacteroidetes a Proteobacteria a zároveň nižší výskyt kmene Firmicutes a třídy *Clostridia*. Některé studie dokonce uvádí, že abnormální metabolismus a odlišné osídlení střevní mikrobioty může souviset se vznikem poruch pozornosti (ADHD) a autistického spektra (Ming et al. 2012). Při poruše autistického spektra byl zaznamenán vyšší výskyt Bacteroidetes a Proteobacteria a nedostatečný výskyt Firmicutes a Actinobacteria, hlavně *Bifidobacteria* (Finegold et al. 2010, Finegold et al. 2012). V případě Parkinsonovy choroby byly u kohorty 72 jedinců vyšší počty *Enterobacteriaceae* a snížené počty *Prevotellaceae*, tento rod bakterií poskytuje mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA), folát a thiamin rozkladem komplexních sacharidů. Tyto vedlejší produkty se podílí na udržení správného střevního mikrobiomu (Pedriali et al. 2008).

3.5.1 Vliv polyfenolů na mikrobiální rozmanitost

Z dostupné literatury je známo, že flavonoidy a jejich metabolity mohou mít vliv na mikrobiální rozmanitost. Xiong et al. (2023) uvádí, že se podílejí na modulaci střevní mikrobioty tím, že pozitivně podporují růst prospěšných mikroorganismů a zároveň inhibují bakterie patogenní. Díky prebiotickým vlastnostem, kterými rostlinné polyfenoly oplývají tak mohou ovlivnit složení střevní mikrobioty a vést k pozitivním účinkům na zdravotní stav člověka (Cardona et al. 2013). Ve studii Dolara et al. (2005), ve které byly potkanům podávány polyfenoly bylo shledáno vyšší zastoupení *Bacteroides*, *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* spp. oproti kontrolní skupině, u nichž převládající mikroorganismy byly *Bacteroides*, *Clostridium* a *Propionibacterium* spp. Podobně byl suplementován resveratrol potkanům v množství 1 mg/kg/den, v důsledku toho byl zvýšen počet lactobacilů, bifidobakterií a snížen výskyt enterobakterií (Larrosa et al. 2009). Příjem polyfenolů díky konzumaci červeného vína po dobu 4 týdnů dokázal proměnit mikrobiální zastoupení a zvýšit zastoupení *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Prevotella*, *Eggerthella lenta* a *Blautia coccooides* (Queipo-Ortuño et al. 2012). Studie Lee et al. (2006) zkoumala kultivaci bakterií s čajovými fenolickými látkami. Bylo zjištěno, že patogenní bakterie, jako jsou *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile* a *Bacteroides* spp., jsou účinkem fenolických látek inhibovány. Dále díky dlouhodobé konzumaci nápoje z divokých borůvek byl shledán zvýšený výskyt bifidobakterií, jež byl přisuzován bohatému výskytu polyfenolů v lesních borůvkách (Vendrame et al. 2011). Eid et al. (2014) se zabývali bakteriálními změnami vzniklými díky extraktu z celé datle na smíšených kulturách napodobující distální část tlustého střeva. Zaznamenali zvýšení počtu bifidobakterií a zároveň došli k závěru, že příjem datlí může být prospěšný pro modulaci diverzity, správnou funkci střev a pro snížení vzniku kolorektálního karcinomu. Také extrakt z hroznových semínek podávaný jedincům po dobu 2 týdnů dokázal výrazně ovlivnit mikrobiální prostředí a zvýšit zastoupení *Bifidobacterium* a snížit počet *Enterobacteriaceae* (Yamakoshi et al. 2001). Ve studii Parkar et al. (2008) zkoumali autoři antibakteriální aktivitu ovocných polyfenolů. Zjistili, že víceméně všechny testované polyfenoly kromě rutinu ovlivňovaly vybrané bakterie (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* a *Lactobacillus rhamnosus*). Naringenan a kvercetin vykazovaly nejvyšší aktivitu s nejnižšími minimálními inhibičními koncentracemi u těchto bakterií. Celkově byl jako nejcitlivější k polyfenolům vyhodnocen *Staphylococcus aureus*.

3.6 Metabolomika

Metabolomika je vědní obor, zabývající se profilováním metabolitů a metabolismu v živých organismech a mimo ně (Wishart 2016). Byla vyvinuta z důvodu možného odhalení poruch v metabolomu, které mohou vzniknout geneticky nebo enviromentálními vlivy (Johnson et al. 2012). Pojem „metabolom“ byl poprvé zaznamenán ve studii Oliver et al. (1998). Je klasifikován jako kvalitativní a kvantitativní soubor molekul s nízkou molekulovou hmotností (Harrigan & Goodacre 2003), které se mohou vyskytovat v buňce, tkáni nebo v biologickém materiálu jako je třeba moč, sliny, krev a mozkomíšni mok (Johnson et al. 2012). Rozsáhlost metabolomu je velmi variabilní. Obecně závisí na předmětu zkoumání. Například *Saccharomyces cerevisiae* zahrnuje kolem 600 metabolitů (Förster et al. 2003). Rostliny obsahují přibližně 200 000 primárních i sekundárních metabolitů (Fiehn 2002). A metabolom člověka bude pravděpodobně mnohem větší (Dunn & Ellis 2005). Kromě stanovení genové funkce u rostlin (Roessner et al. 2002), mikroorganismů (Raamsdonk et al. 2001) a zvířat se metabolomika využívá i v mnoha jiných případech. Mezi ně patří například: stanovení metabolických biomarkerů, které působí jako indikátor vznikající nemoci (Bragg et al. 2022), stanovení mikrobiálního oxidačního stresu (Pan et al. 2021), charakterizace bakterií (Bertini et al. 2014), hodnocení zdravotního stavu člověka a výživy (Watkins & German 2002a) a využívá také nachází při vývoji léků (Aларcon-Barrera et al. 2022)

Pro usnadnění metabolomického výzkumu byla v roce 2007 sestavena databáze lidského metabolomu. Jedná se o volně dostupný webový zdroj. Konkrétně tato sbírka obsahuje seznam 114 100 metabolitů a 25 570 metabolických drah (Wishart et al. 2018). Pro představu lidský metabolom obsahuje všechny malé molekuly, které jsou přítomné v lidském těle (lipidy, peptidy, aminokyseliny, nukleové kyseliny, organické kyseliny, sacharidy, biogenní aminy, minerální látky, vitamíny, polyfenoly, alkaloidy) a jakékoliv chemické látky se kterými člověk přichází do styku a jež se v těle dále metabolizují (Wishart 2008).

Metabolom organismu je ovlivňován geny, životním stylem, stravou a střevní mikrobiotou (Mi et al. 2020). Navíc se ukazuje, že metabolický fenotyp jedince může poukázat na abnormální fyziologický nebo biochemický stav (Burgdorf et al. 2010).

3.6.1 Metabolická dysregulace

Metabolity vznikají jako meziprodukty nebo konečné produkty metabolismu. Jsou součástí biochemických drah a jsou dále přeměňovány na látky jednodušší nebo naopak složitější. Využívají se ke skladování a získávání energie, přenosu signálu nebo jsou vyloučeny jako odpadní látka organismu (Johnson et al. 2016).

Narušená metabolická regulace je příčinou různých onemocnění, jako jsou například kardiovaskulární (Bi et al. 2021), neuronální (Yan et al. 2020), nádorová onemocnění (Erez & DeBerardinis 2015) a diabetes mellitus (Fiehn et al. 2010). Dochází při ní k abnormální výměně látek, energie, ke vzniku změn v metabolických drahách a výkyvům meziproduktů nebo konečných produktů. Na druhou stranu tyto změny mohou často sloužit jako vhodné biomarkery sloužící pro diagnostiku onemocnění nebo lze dle nich určit terapeutické cíle (Krumstiek et al. 2012).

Studie Mi et al. (2020) tvrdí, že většina metabolitů, které souvisí s onemocněním se soustřeďují převážně v metabolických drahách metabolismu aminokyselin a metabolismu lipidů. Zároveň uvádí, že onemocnění jako je Crohnova choroba, Alzheimerova choroba a kolorektální karcinom korelují s metabolismem aminokyselin.

Ve studii Zhou et al. (2016) analyzovali metabolické vzorce u pacientů s revmatoidní artritidou a porovnávali je s kontrolní skupinou. Jejich výzkum ukázal výrazné rozdíly v metabolických profilech mezi pacienty s revmatoidní artritidou a zdravou kontrolní skupinou. Paige et al. (2007) provedli podobnou analýzu u pacientů s depresí a porovnávali je s jedinci v remisi a jedinci, kteří nikdy netrpěli depresemi. Jejich výsledky naznačily, že jedinci s depresí vykazovali změny v metabolismu lipidů a neurotransmiterů.

3.6.2 Mikrobiální metabolomika

Mikrobiální metabolomika se zabývá kvalitativním a kvantitativním vyhodnocováním nízkomolekulárních látek mikroorganismů pomocí metabolomických metod (Muthubharathi et al. 2021). Popisuje vzájemné vztahy a přenos informací mezi mikroorganismy s ohledem na změny v metabolitech. A zároveň napomáhá lepšímu porozumění fyziologickému stavu mikroorganismů (Covington et al. 2017). Jedná se o obor systémové biologie, který zároveň dokáže přiblížit vliv mikroorganismů na metabolismus hostitele. V poslední době je mikrobiální metabolomika užívaná zejména pro studium reakce bakterií na antibiotika (Lobritz et al. 2015, Belenky et al. 2015), identifikaci nových bakteriálních druhů (Palama et al. 2016) a vliv střevního mikrobiomu na vznik onemocnění (Nemet et al. 2020).

Výzkum v oblasti střevní mikrobiální metabolomiky je jedinečným nástrojem pro mapování metabolických vzorců střevního mikrobiomu a vyhodnocení vztahu mezi střevní mikrobiotou a hostitelem. V této oblasti výzkumu ovšem panují značná omezení, které zabraňují bližšímu porozumění. Konkrétně zde panuje otázka, z jakého důvodu metabolické změny vznikají a které střevní bakterie je způsobují. Vyhodnocení komplikuje i to, že střevní metabolity jsou značně heterogenní vzhledem k tomu, že vytvářejí směs spolu s nestrávenou potravou a sekrety hostitele. Zároveň vyhodnocení komplikují dostupné databáze, které nejsou dostatečně komplexní, což představuje překážku pro celkové hodnocení v rámci vysoce výkonných metabolomických studií (Yan et al. 2016).

3.6.3 Analytické metody v metabolomice

Pro identifikaci metabolitů existuje hned několik metod. Mezi ty nejčastěji využívané patří NMR (nukleární magnetická rezonance) a plynová chromatografie (GC), kapalinová chromatografie (LC), kapilární elektroforéza (CE), které se využívají ve spojení s hmotnostní spektrometrií (MS). Pro získání širokého pohledu na metabolom je zapotřebí kombinace metod, jelikož každá analytická metoda se liší analýzou rozsahu polarit a molekulové hmotnosti. Zároveň má každá technika své výhody a nevýhody (tab. 1) (Shulaev 2006).

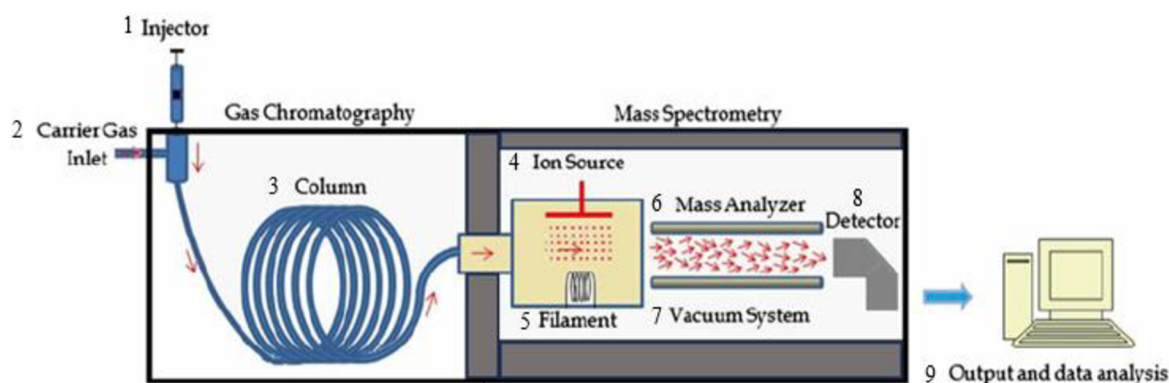
Tabulka č. 1: Výhody a nevýhody analytických metod používaných v metabolomice (upraveno dle: Shulaev 2006).

Analytické metody	Výhody	Nevýhody
NMR	<ul style="list-style-type: none">• Rychlá analýza• Není nutná deprivatizace• Nedestruktivní	<ul style="list-style-type: none">• Nízká citlivost• Knihovny omezené použití kvůli matici
GC-MS	<ul style="list-style-type: none">• Citlivá• Velký lineární rozsah• Velké komerční a veřejné knihovny	<ul style="list-style-type: none">• Pomalá• Často vyžaduje derivatizaci• Mnoho analytů tepelně nestabilních
LC-MS	<ul style="list-style-type: none">• Obvykle není nutná derivatizace• K dispozici mnoho způsobů separace• Velká kapacita vzorků	<ul style="list-style-type: none">• Pomalá• Omezené komerční knihovny
CE-MS	<ul style="list-style-type: none">• Vysoká separační síla• Stačí malé množství vzorku• Rychlá analýza• Obvykle žádná derivatizace	<ul style="list-style-type: none">• Omezené komerční knihovny• Špatná reprodukovatelnost retenční doby

3.6.3.1 Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií

Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS) je v současné době oblíbená zejména pro rychlé profilování metabolitů. Díky ní lze identifikovat několik stovek chemických sloučenin, a to i sacharidy, cukerné alkoholy, většinu aminokyselin, organické kyseliny, aromatické aminy a mastné kyseliny (Roessner et al. 2000). Nicméně některé metabolity musí být nejdříve derivatizovány než jsou dále analyzovány pomocí GC-MS, kvůli snížení polarizace a usnadnění chromatografické separace (Halket et al. 2005). Ve studii Angioni et al. (2023) byla plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií užita například pro studium metabolických změn, které se vyskytují u žen s endometriózou, s cílem nalezení nových funkčních biomarkerů nemoci.

Plynový chromatograf funguje na principu oddělování složek vzorku, které jsou převáděny do plynné fáze. Jednotlivé složky jsou tudíž rozdělovány mezi pohyblivou (mobilní) a nepohyblivou (stacionární) fázi. Mobilní fázi v plynové chromatografii je nosný plyn. Zdrojem nosného plynu je tlaková láhev obsahující dusík, vodík, argon nebo helium. Stacionární fáze je umístěna v koloně. Vzorek je dávkován do proudu plynu (obr. 5). Nástřík musí zajistit odpaření vzorku v co nejkratším možném čase. Následně je vzorek unášen kolonou (Bartle & Myers 2002) a dochází k opakované sorpci a desorpci ke které dochází pohybem analytů kolem stacionární fáze nosným plynem. Separace je uskutečněna díky rozdílu v distribučních koeficientech složek ve směsi (Niessen 2001). Následně je napojen hmotnostní spektrometr, který zajišťuje identifikaci. Zde vzorek ionizuje. Ionty jsou odděleny podle poměru hmotnosti k náboji v hmotnostním analyzátoru. Následně jsou separovány hmotnostním filtrem a detekovány pomocí detektoru, který převádí ionty na elektrické signály. Posledním krokem je vyhodnocení signálu, který je přenesen do počítače (Hoffmann & Stroobant 2007).



1 dávkovač, 2 vstup nosného plynu, 3 kolona, 4 iontový zdroj, 5 vlákno, 6 hmotnostní analyzátor, 7 vakuový systém, 8 detektor, 9 výstup a analýza dat

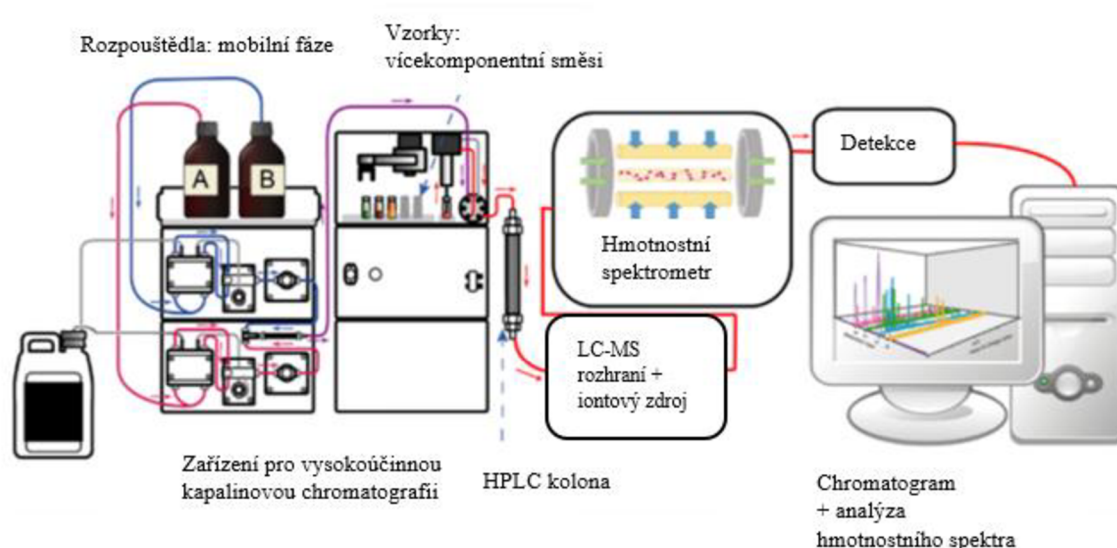
Obrázek č. 5: Schéma hlavních komponent přístroje GC-MS (upraveno dle: Emwas et al. 2015).

3.6.3.2 Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií

Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS) disponuje vysokou citlivostí a rozsahem polarity analytu a molekulové hmotnosti, která je širší než u GC-MS. Právě proto je tato metoda v metabolomice stále používanější. Její výhodou je, že oproti metodě GC-MS není potřeba chemická derivatizace metabolitů. Ta je vyžadována při užití GC-MS metody u netěkavých sloučenin. Podstatnou nevýhodou LC-MS je nedostatečné množství přenositelných knihoven hmotnostních spekter. Nicméně ji lze využít ke znázornění struktury neznámých sloučenin (Shulaev 2006). Pro lepší kvantifikaci metabolitů v biologických systémech je třeba velmi často kombinovat více technik pro profilování metabolitů, například hmotnostní spektrometr s elektrosprejovou ionizací (Tolstikov & Fiehn 2002).

LC-MS (obr. 6) využívá čerpací systém, jež se liší ve výkonnosti u vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a ultravysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC). Dále LC-MS využívá dávkovač a kolonu, která je s hmotnostním spektrometrem spojena přes odpařovací ionizační rozhraní. Řízení průtoku mobilní fáze, gradientu rozpouštědla, spuštění nástřiku a gradientového běhu má na starosti počítačový systém. Ten dále řídí hmotnostní detektor a zajišťuje spuštění signálu. Tento signál je následně digitalizován a převeden na data, která jsou odeslána z hmotnostního spektrometru do počítače. Na základě detekce v hmotnostním spektrometru vzniká spektrum, které je vytvořeno v závislosti na retenčním čase, intenzitě iontů a poměru hmotnosti a náboje (m/z) (McMaster 2005).

V metabolomice se kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií často užívá ke studiu metabolismu léčiv (Chen et al. 2007). Nicméně užití metody založené na LC-MS bylo zaznamenáno také například u posuzování masných výrobků (Harlina et al. 2022), identifikaci metabolitů rostlin (Guo et al. 2022), biomarkerů karcinomu močového měchýře (Oto et al. 2022) a při studiu buněčných metabolických profilů (Schönberger et al. 2023).



Obrázek č. 6: Schématický diagram systému LC-MS (upraveno dle: Kailasam 2021).

3.6.3.3 Kapilární elektroforéza s hmotnostní spektrometrií

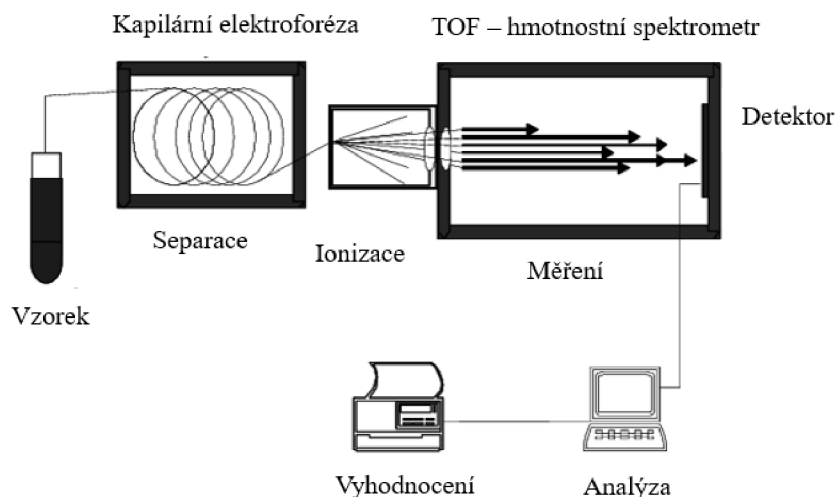
Kapilární elektroforéza s hmotnostní spektrometrií (CE-MS) se v metabolomice využívá oproti všem separačním technikám méně častěji. Důvodem je, že tato analytická metoda je stále vnímána jako metoda se špatnou reprodukovatelností a nízkou citlivostí (Ramautar 2016). Z tohoto důvodu není brána jako dostatečně spolehlivá pro globální screening a vysoce citlivé analýzy stopových hladin metabolitů (Zhang et al. 2019).

CE-MS je zvláště účinná pro profilování polárních a nabitých metabolitů. Například pro třídy sloučenin, kam patří aminokyseliny, fosforylované, sulfátové sloučeniny (Drouin et al. 2018) a nukleotidy (Liu et al. 2014). Kapilární elektroforéza s hmotnostní spektrometrií je oblíbená v případech, kde je analyzováno velmi malé množství vzorku, a to od tělesných tekutin malých zvířecích modelů až po nízký počet savčích buněk (Zhang et al. 2017). Této skutečnosti využila například studie Segers et al. (2020), která analyzovala myší plazmu a zkoumala, jaké metabolity mohou souviset s aktivitami, které vedou k epileptickým záchvatům.

Principem kapilární elektroforézy je separace sloučeniny na základě rozdílů pohyblivosti v elektrickém poli. Ta je ovlivněna velikostí a nábojem analytu. Čím vyšší je elektrické pole, tím větší je pohyblivost. Separace se odehrává v kapiláře, která je naplněna separačním pufrem, pod vlivem elektrického pole. Oproti chromatografickým metodám je separační účinnost kapilární elektroforézy daleko vyšší, jelikož zde neprobíhá přenos hmoty mezi fázemi (Zhang et al. 2017).

Kapilární elektroforéza kombinovaná s elektrosprejovou ionizační hmotnostní spektrometrií (ESI-MS) je uznávána jako jeden z velmi důležitých nástrojů, které se využívají pro analýzu ionizovatelných polárních sloučenin (Ramautar et al. 2009). ESI-MS vyžaduje chemickou separaci před ionizací, tím dochází ke zvýšení selektivity, snižuje přetíženost hmotnostního spektra a částečně potlačuje ionizaci u elektrospreje (Kelly et al. 2014). Ve studii Ramautar et al. (2012) demonstrovali proveditelnost CE-MS konkrétně s bezplášťovým nanosprejovým rozhraní za užití nízkoobjemových biologických vzorků experimentálních zvířat. A následně došli k závěru, že tato metoda lze účinně aplikovat pro citlivé metabolické profilování mnoha biologických vzorků.

Kapilární elektroforéza ve spojení s TOF hmotnostním spektrometrem (obr. 7) umožňuje větší spolehlivost například při kontrole kvality potravin (Pont et al. 2020). Využita byla například ve studii Mever et al. (2022), jež hodnotila kvalitu polských vín za užití necílené metabolomiky CE-TOF-MS, kde sloužila pro profilaci polárních ionogenních metabolitů. Jiné využití našla ve studii Taniguchi et al. (2020), kde CE-TOF-MS sloužila pro profilování metabolitů plazmy prasat. Jejich výsledky pomohly navržením biomarkerů pro obsah intramuskulárního tuku v oblasti beder, jež slouží jako indikátor kvality vepřového masa.



Obrázek č. 7: Schéma systému CE-MS (upraveno dle: Mischak-Weissinger & Mischak 2004).

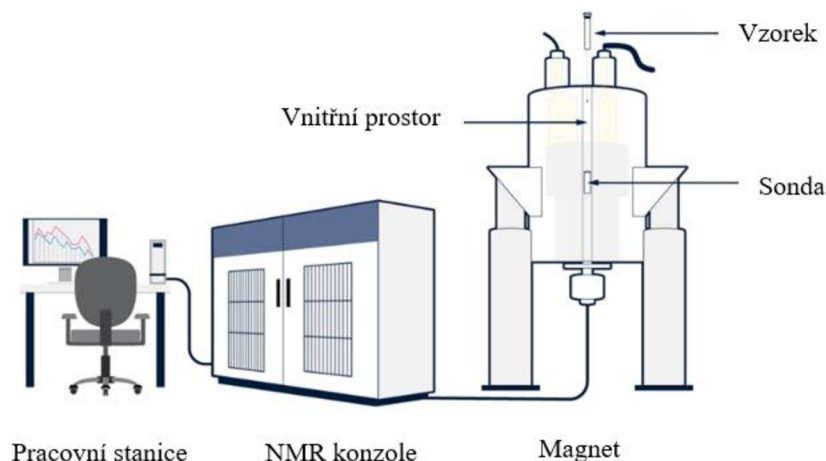
3.6.3.4 NMR

V oblasti metabolické analýzy patří mezi významné metody i spektroskopie nukleární magnetické rezonance (NMR) (Lambert et al. 2019). Jedná se o nedestruktivní, rychlou a poměrně výkonnou metodu s minimální potřebou přípravy vzorku (Shulaev 2006). NMR umožňuje detailní analýzu dynamiky, struktury a kinetiky ve velkém množství chemických látek (Abhyankar & Szalai 2021). Ovšem její relativně nízká citlivost při profilování metabolitů je důvodem, proč není ideální pro výzkum metabolitů s omezeným výskytem (Shulaev 2006). Její výhodou je, že dokáže vyhodnotit všechny tři stavy hmoty. Navíc, pro vznik některých spekter stačí dokonce méně než mikrogram materiálu (Lambert et al. 2019).

NMR vyniká mezi jinými spektroskopickými metodami tím, že zkoumá atomová jádra a pracuje s měřením energie v oblasti radiofrekvenční. Pracuje na analýze jader, která mají tzv. moment hybnosti, který je definován charakteristickým spinovým kvantovým číslem (I). Mezi nejčastěji studovanými jádry jsou protony ^1H a izotopy ^{13}C , ^{31}P a ^{19}F , která všechna sdílejí spin $I=1/2$. Tato jádra jsou nabitá a jejich spinový náboj vytváří magnetické pole. Dalo by se říct, že jádra se chovají jako malé magnety, které interagují s vnějším magnetickým polem (B_0) (Reuhs & Simsek 2017). Jádra atomů s jaderným spinem mohou zaujmout dvě orientace. První se nazývá paralelní $+1/2$ (ve shodě se směrem vnějšího magnetického pole) a odpovídá nejnižší energetické hladině jádra. Druhá orientace se nazývá antiparalelní $-1/2$ (proti směru vnějšího magnetického pole) a je spojována s nejvyšší energetickou hladinou jádra (Wider 2000). Ve chvíli, kdy jsou jádra ozářena radiofrekvencí, dochází k magnetické rezonanci, což zahrnuje přechody mezi energetickými hladinami a změny v orientaci jaderných spinů (Carreras 2021).

NMR se skládá ze 3 částí: výkonného kryomagnetu se sondou (dovnitř magnetu se umísťuje vzorek), komplexního elektronického systému (konzole) pro přenos, sběr

a transformaci elektrických signálů ze, nebo do sondy a pracovní stanice (obr. 8). V současné době se využívají supravodivé magnety, které musí být udržovány při nízké teplotě. Proto NMR obsahuje chladicí systém, který je složen z vnitřního pláště s kapalným heliem a vnějším pláštěm s kapalným dusíkem (Reuhs & Simsek 2017).



Obrázek č. 8: Obecná konstrukce NMR spektrometru (upraveno dle: Carreras 2021).

Magnet, který je ochlazen na provozní teplotu pomocí chladicí kapaliny a je trvale napojen na napájecí zdroj si dokáže udržet svoje magnetické pole a náboj roky. Důležité je ovšem pravidelné doplňování chladicí kapaliny. Při nedostatečné údržbě magnet ztratí svůj náboj (Reuhs & Simsek 2017).

Uprostřed magnetu se nachází válcovitá komora, která se nazývá sonda. Zde se umísťuje vzorek. Uvnitř sondy jsou umístěny malé magnetické cívky. Tyto cívky jsou napojeny na hardware NMR a lze pomocí nich upravovat homogenitu magnetického pole. Dále sonda obsahuje cívky, které mají na starosti vysílání a příjem radiofrekvenční energie. Magnetická sonda je napojena na konzoli, která slouží jako vysílač, přijímač a systém pro regulaci teploty vzorku (Reuhs & Simsek 2017).

Při analýze v NMR dochází k absorpci a opětovné emisi elektromagnetického záření v rezonanční frekvenci, která se pohybuje zpravidla mezi 40–1000 MHz (oblast radiofrekvenčního pásma) (Rhodes 2017). Využívá se působení radiofrekvenčních pulzů a silných magnetických polí na jádra atomů. Vlivem magnetického pole dojde u jader atomů s nenulovým spinovým kvantovým číslem (např. ^{13}C) nebo (^1H) k orientaci jejich magnetického momentu vzhledem k magnetickému poli. Absorpcí elektromagnetického pulzu jsou jádra převedena do vyšší energetické úrovně. Po ukončení pulzu se tato jádra vrací zpět do původního stavu. Při návratu atomových jader na nižší energetickou úroveň emitují energii ve formě radiových vln. A tento emitovaný signál je následně zachycen a analyzován (Dunn et al. 2005).

3.7 Využití NMR

NMR vykazuje rozsáhlou škálu využití, zahrnující charakterizaci přírodních extraktů, biologických vzorků a potravin (Larive et al. 2015, Hatzakis 2019). Například Klünemann et al. (2021) v rámci svého výzkumu využili NMR k analýze extraktů mikroorganismů ze střevního mikrobiomu, s cílem porozumět bioakumulaci terapeutických léků ve střevě. Kostidis et al. (2017) taktéž využili vlastností NMR pro analýzu intra a extracelulárního metabolismu u savčích buněk. NMR se rovněž osvědčila při identifikaci primárních a sekundárních metabolitů rostlin (Kim et al. 2010). V potravinářství byla tato metoda úspěšně využita například pro analýzu chemického profilu vína a hodnocení jeho pravosti (Solovyev et al. 2021). Rovněž byla úspěšně aplikována pro analýzu biofluidních tekutin jako je plazma, moč, sérum a tkáňové extrakty (Beckonert et al. 2007).

NMR je klíčovou metodou pro metabolomickou analýzu zejména díky své široké použitelnosti (Watkins & German 2002b). Výhodou je její vysoká reprodukovatelnost, která je klíčovým prvkem v epidemiologických studiích. V rámci těchto studií se NMR obvykle využívá k odhalování biomarkerů spojených s nástupem a progresí onemocnění. Cílem je identifikovat metabolity spojené s konkrétními onemocněními, což následně usnadňuje diagnostiku a léčbu daného onemocnění (Emwas et al. 2013). Sledování poruch metabolitů a identifikace metabolických drah se ukázalo jako užitečné například při studiu reakce organismu na léčbu nádoru (Morvan & Demidem 2007). Také umožňuje brzkou diagnostiku možné sepse a septického šoku u pacientů na jednotce intenzivní péče (Garcia-Simon et al. 2015). Tímto způsobem NMR přináší cenné informace, které mohou přispět k lepšímu pochopení patofyziologie a léčby různých onemocnění.

4 Metodika

4.1 Buněčné kultury

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

4.2 Hodnocení cytotoxicity

K určení bezpečných koncentrací mikrobiálních katabolitů rutinu a jejich strukturálně podobných látek, které byly aplikovány v následujícím metabolomickém experimentu na linii buněk Caco-2, byl realizován předběžný test cytotoxicity. Tento test využíval činidlo WST-1 (vodou rozpustná tetrazoliová sůl) k posouzení schopnosti buněk redukovat toto činidlo na formazon, čímž se zvýší absorbance měřeného vzorku, která signalizuje přítomnost živých buněk. Pro tento účel byly buňky distribuovány do 96-jamkových destiček o hustotě 2×10^4 buněk na jamku a byly inkubovány po dobu 24 hodin při 37 °C a 5% CO₂. Poté byly buňky vystaveny různým koncentracím katabolitů: $c_1= 400 \mu\text{g/ml}$, $c_2= 200 \mu\text{g/ml}$, $c_3= 100 \mu\text{g/ml}$, $c_4= 50 \mu\text{g/ml}$, $c_5= 25 \mu\text{g/ml}$, $c_6= 12,5 \mu\text{g/ml}$, $c_7= 6,25 \mu\text{g/ml}$, a kontrolní skupina $c_0= 0 \mu\text{g/ml}$, a inkubovány dalších 24 hodin za stejných podmínek. Po uplynutí 24 hodin bylo médium s testovanými látkami odsáto a do každé jamky bylo následně přidáno 110 μl média s WST-1 reagensii v poměru 10:1. Po hodinové inkubaci byla změřena absorbance každé jamky pomocí spektrofotometru (Perkin Elmer Victor 2 V, USA). Životaschopnost buněk byla vyčíslena z porovnání absorbance ošetřených a kontrolních buněk, přičemž test byl proveden ve třech opakováních. Průměrná životaschopnost nižší než 90 % byla považována za indikaci toxické koncentrace použitých katabolitů. Pro účely metabolomického studia byly vybrány koncentrace desetkrát nižší než nejnižší koncentrace vykazující toxicitu (tab. 2).

Tabulka č. 2: Finální koncentrace mikrobiálních katabolitů rutinu a jim strukturálně podobných látek použitých při metabolomickém experimentu na Caco-2 buněčné linii, stanovené testem viability

Látka	Koncentrace látky
3-OHPAA	40 µg/ml
4-OHPAA	40 µg/ml
3-OHPPA	40 µg/ml
3,4-diOHPAA	10 µg/ml
Kvercetin	2,5 µg/ml
Kyselina kávová	40 µg/ml
Kyselina dihydrokávová	20 µg/ml
Rutin	10 µg/ml
Kontrolní medium (DMEM+10%FBS)	0 µg/ml

4.3 Metabolomický experiment na Caco-2 buněčné linii

Buňky linie Caco-2 byly nejprve pročištěny od původního média, následně resuspendovány v DMEM při hustotě 6×10^5 buněk na 1 ml a vysázeny na Petriho misky o průměru 100 mm. Inkubace (37 °C a 5% CO₂ atmosféra) buněk probíhala v 10 ml DMEM s přidavkem 10 % ml fetálního bovinního séra (FBS), 1 % neesenciálních aminokyselin (NEAA) zakoupených od společnosti Sigma-Aldrich. Proces diferenciací trval 14 dní, během kterých bylo médium pravidelně obměňováno každé 2-3 dny. Poté byly buňky ošetřeny DMEM obsahujícím mikrobiální katabolity rutinu a jim strukturálně podobné látky v koncentraci určené cytotoxickým testem (tab. 2) a 10 % FBS, 1 % NEAA a inkubovány 24 hodin při stejných podmínkách. Experiment byl zhotoven ve třech biologických opakováních, ke kterým byly použity devátá, desátá a jedenáctá buněčná pasáž.

4.4 Příprava vzorků média

Po 24hodinové inkubaci bylo z Petriho misek odebráno 2 ml média, které bylo přidáno do zkumavky obsahující 4 ml chlazeného 90% methanolu (předem chlazeného na -80 °C po dobu 24 hodin) za účelem rychlé inaktivace enzymů. Tyto zkumavky byly ihned přemístěny do -20 °C a do 30 minut centrifugovány (4 °C, 16 000 g, 10 min). Následně bylo odebráno 5 ml supernatantu, který byl převeden do lyofilizátoru a sušen do sucha po dobu 24 hodin. Vysušené vzorky byly uloženy při -80 °C do doby analýzy pomocí ¹H NMR spektrometrie.

4.5 Příprava vzorků pro NMR analýzu

Odpařená média v 15 ml falkonkách byla resuspendována v 700 µl deuterované vody (D₂O). Pro zhomogenizování byl u jednotlivých vzorků použit Vortex po dobu 30 sekund. Veškerý obsah falkonek byl převeden do mikrozkuvek Eppendorf. Jednotlivé vzorky byly pročištěny centrifugací (5 min, 4 °C, 15 000 rpm). Poté bylo z každé mikrozkuvky odebráno 630 µl supernatantu a převedeno do předem připravených a nových

mikrozkumavek. Do nich bylo přidáno 70 μ l NMR pufru (s TSP, pH 7.4). Následně byly znovu podrobeny Vortexu a centrifugaci (5 min, 4 °C, 15 000 rpm). Nakonec bylo odebráno 600 μ l supernatantu do NMR zkumavky.

4.6 ^1H NMR spektrometrie

Spektra byla změřena na spektrometru Bruker Avance III vybaveném broadband observation sondou (BBFO) SmartProbe s gradienty v ose Z (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Německo), který k práci využívá protonovou frekvenci 500,23 MHz. Teplota měření byla 298 K (25 °C). ^1H NMR spektra byla získána a zpracována za stejných podmínek. Pro potlačení signálu vody byla použita pulzní sekvence noesypr1d při 4,704 ppm. Pro každý vzorek byl použit jednodimenzionální ^1H experiment s následujícími parametry: počet skenů NS 128, počet datových bodů 32k při šířce spektra 16 ppm, relaxační prodleva 1 s, akviziční čas 4 s, směšovací čas 0,1 s. Ladění přístroje, kalibrace 90° pulzu a šimování byly optimalizovány automaticky pomocí standardních automatických rutin (atma, lock, rga, pulsecal a topshim). Signál volné precese (FID) byl před Fourierovou transformací zpracován zero filling, line broadening 0,3 Hz a exponenciální multiplikací. Spektra byla manuálně fázována a referencována na TSP 0.00 ppm v programu Topspin. Alignment a export spekter byl proveden v programu Mestrenova, anotace látek a kvantifikace v programu Chenomx 8.5.

4.7 Zpracování spekter

Spektra byla referencována na TSP (0.00 ppm) v programu Topspin. Manuální fázování, úprava základní čáry referenční linie, alignment a export spekter byl proveden v programu Mestrenova verze 14.2.3. Podmnožina spekter byla anotována pomocí Chenomx Profiler verze 8.6, využívající předinstalovanou spektrální knihovnu a vlastní interní databázi. Pro každou anotovanou sloučeninu byl vybrán reprezentativní, čistý, odlišný a kvantitativní interval ppm, na jehož základě byla další spektra kvantifikována pomocí regresních rovnic.

4.8 Statistické vyhodnocení

Pro vyhodnocení získaných dat byl použit statistický program IBM SPSS Statistics a Microsoft Excel. Byl využit párový t-test pro jednotlivá biologická opakování.

5 Výsledky

V ^1H NMR spektru bylo identifikováno celkem 34 metabolitů. Metodou, která byla použita pro kvantifikaci látek se podařilo z 34 metabolitů spolehlivě kvantifikovat 31. Jednotlivé metabolity zobrazuje tabulka č. 3.

Tabulka č. 3: Přehled metabolitů ve vzorcích

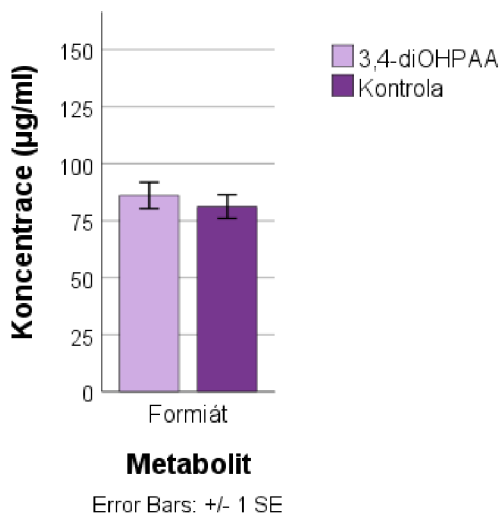
Kvantifikované látky	Nekvantifikované látky
Glycin	Isopropanol
Alanin	Hydroferulová kyselina
Valin	Glutamin
Leucin	
Isoleucin	
Methionin	
Prolin	
Fenylalanin	
Tryptofan	
Threonin	
Asparagin	
Tyrosin	
Lysin	
Histidin	
Acetát	
Sukcinát	
Fumarát	
Formiát	
Laktát	
Pyroglutamát	
Glucosa	
Fruktosa	
Methanol	
Ethanol	
Glycerol	
Myo-Inositol	
2-hydroxyisovalerát	
3-hydroxyisovalerát	
2-methylglutarát	
Kyselina p-hydroxyfenyloctová	
Kyselina 3-hydroxyfenyloctová	

Po kvantifikaci byl proveden párový t-test na základě buněčných pasáží a byly stanoveny signifikantní látky v porovnání s kontrolním vzorkem. Celkem bylo stanoveno 18 signifikantních látek (tab. 4). V katabolitech 3-OHPPA a 4-OHPAA nebyl shledán žádný signifikantní metabolit. Z toho můžeme vyvodit, že 3-OHPPA a 4-OHPAA nijak neovlivnily metabolismus Caco-2 buněk, který by se projevil v médiu. Jiné katabolity rutinu naopak dokázaly ovlivnit metabolismus Caco-2 nárůstem nebo poklesem alespoň jedné látky v médiu.

Tabulka č. 4: Množství metabolitů v porovnání s kontrolním médiem

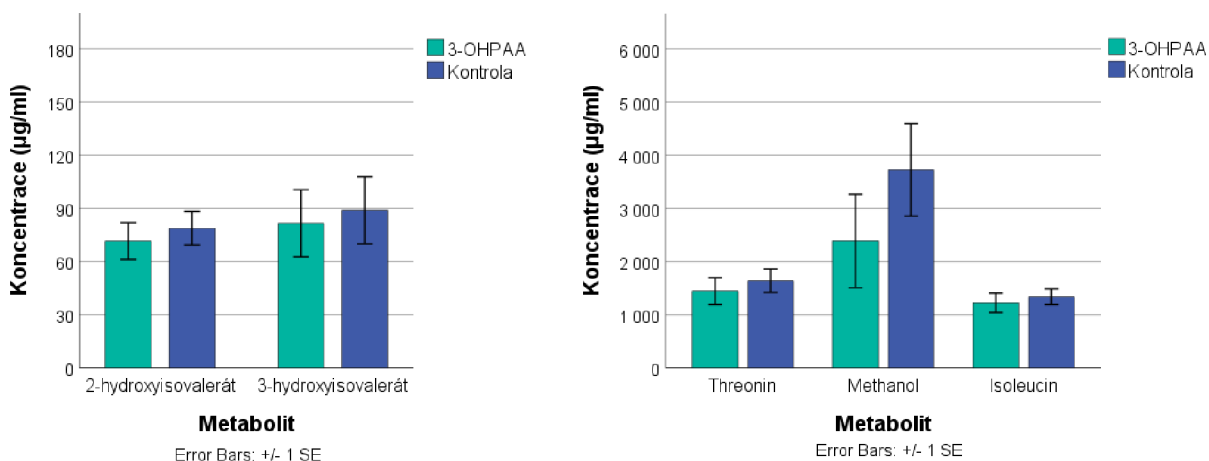
Signifikantní	3,4-diOHPAA	3-OHPAA	Kvercetin	Kys. kávová	Kys. dihydrokávová	Rutin
Methionin				↓		
Leucin			↓			
Isoleucin		↓				
Asparagin			↑			↑
Threonin		↓				
Fenylalanin			↓			
Histidin				↑		
Glukosa				↑		
Methanol		↓				
Myo-inositol						↑
Acetát				↑		
Fumarát					↓	
Sukcinát			↓			
Formiát	↑				↑	
2-hydroxyisovalerát		↓	↓			
3-hydroxyisovalerát		↓				
Kyselina p- hydroxyfenyloctová				↑		
Kyselina 3- hydroxyfenyloctová					↑	

Inkubace 3,4-diOHPAA s buňkami Caco-2 vedla ke zvýšení koncentrace formiátu o 5 µg/ml (obr. 9). Byl zaznamenán nárůst o 6 % vůči kontrole se směrodatnou odchylkou ($\sigma = 8,11$ µg/ml).



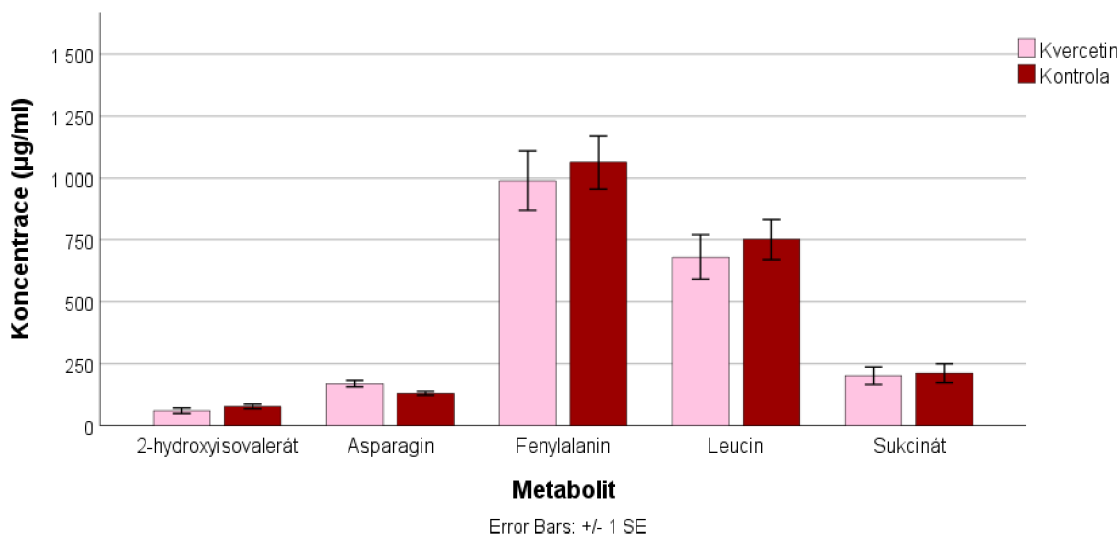
Obrázek č. 9: Rozdíly v koncentracích metabolitů vlivem aplikace 3,4-diOHPAA

Inkubace s 3-OHPAA naopak ovlivnila metabolismus Caco-2 buněk snížením koncentrace 5 látek (obr. 10). Přesněji isoleucinu o 118 µg/ml (pokles o 9 %, $\sigma = 240,48$ µg/ml), threoninu o 194 µg/ml (pokles o 12 %, $\sigma = 347,82$ µg/ml), methanolu o 1 339 µg/ml (pokles o 36 %, $\sigma = 1406,22$ µg/ml), 2-hydroxyisovalerátu o 8 µg/ml (pokles o 10 %, $\sigma = 14,54$ µg/ml) a 3-hydroxyisovalerátu o 7 µg/ml (pokles o 8 %, $\sigma = 26,92$ µg/ml). Nejvyšší rozdíl v koncentraci vůči kontrole byl pozorován u methanolu. Pro detailnější přehled rozdílů mezi koncentracemi byl graf rozdělen na dvě části.



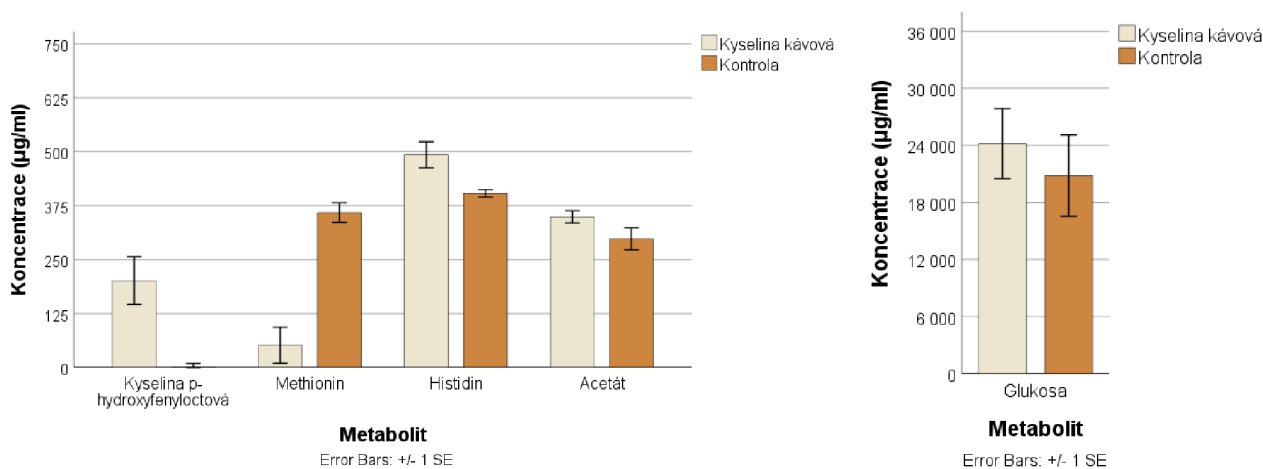
Obrázek č. 10: Rozdíly v koncentracích metabolitů vlivem aplikace 3-OHPAA

Ve vzorcích s kvercetinem byly pozorovány v porovnání s kontrolou snížené koncentrace leucinu o 70 $\mu\text{g/ml}$ (pokles o 9 %, $\sigma = 125,16 \mu\text{g/ml}$), fenylalaninu o 73 $\mu\text{g/ml}$ (pokles o 7 %, $\sigma = 164,65 \mu\text{g/ml}$), sukcinátu o 10 $\mu\text{g/ml}$ (pokles o 5 %, $\sigma = 52,57 \mu\text{g/ml}$), 2-hydroxyisovalerátu o 18 $\mu\text{g/ml}$ (pokles o 23 %, $\sigma = 17,24 \mu\text{g/ml}$) a zvýšené koncentrace asparaginu o 37 $\mu\text{g/ml}$ (nárůst o 28 %, $\sigma = 23,94 \mu\text{g/ml}$) (obr. 11).



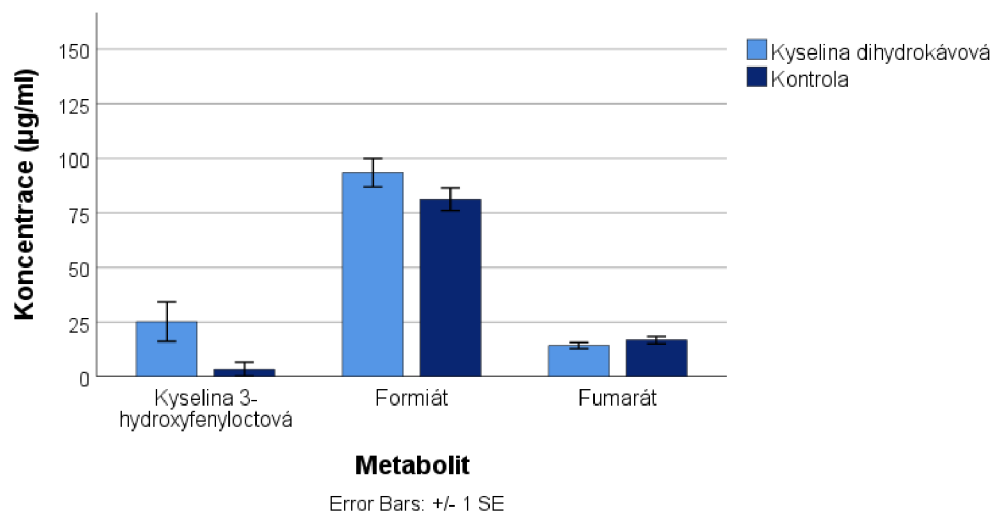
Obrázek č. 11: Rozdíly v koncentracích metabolitů vlivem aplikace kvercetinu

V přítomnosti kyseliny kávové byla zaznamenána zvýšená koncentrace histidinu o 90 $\mu\text{g/ml}$ (nárůst o 22 %, $\sigma = 54,68 \mu\text{g/ml}$), glukosy o 3 362 $\mu\text{g/ml}$ (nárůst o 16 %, $\sigma = 5 905,22 \mu\text{g/ml}$), acetátu o 51 $\mu\text{g/ml}$ (nárůst o 17 %, $\sigma = 38,80 \mu\text{g/ml}$) a kyseliny p-hydroxyfenyloctové z 0 $\mu\text{g/ml}$ na 201 $\mu\text{g/ml}$, tudíž o 201 $\mu\text{g/ml}$ ($\sigma = 115,17 \mu\text{g/ml}$). A naopak se snížila koncentrace methioninu o 307 $\mu\text{g/ml}$ (pokles o 86 %, $\sigma = 160,81 \mu\text{g/ml}$) (obr. 12).



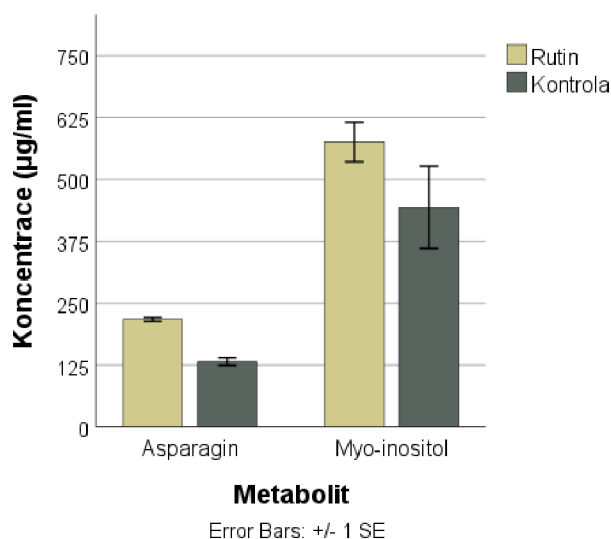
Obrázek č. 12: Rozdíly v koncentracích metabolitů vlivem aplikace kyseliny kávové

V přítomnosti kyseliny dihydrokávové byly pozorovány zvýšené koncentrace formiátu o 12 $\mu\text{g/ml}$ (nárůst o 15 %, $\sigma = 10,35 \mu\text{g/ml}$), kyseliny 3-hydroxyfenyloctové o 22 $\mu\text{g/ml}$ (nárůst o 733 %, $\sigma = 14,47 \mu\text{g/ml}$) a snížené koncentrace fumarátu o 3 $\mu\text{g/ml}$ (pokles o 18 %, $\sigma = 2,52 \mu\text{g/ml}$) (obr. 13).



Obrázek č. 13: Rozdíly v koncentracích metabolitů vlivem aplikace kyseliny dihydrokávové

Při inkubaci Caco-2 buněčné linie s rutinem byly zjištěny zvýšené koncentrace asparaginu o 85 $\mu\text{g/ml}$ (nárůst o 64 %, $\sigma = 43,46 \mu\text{g/ml}$) a myo-inositolu o 132 $\mu\text{g/ml}$ (nárůst o 30 %, $\sigma = 113,56 \mu\text{g/ml}$) (obr. 14).



Obrázek č. 14: Rozdíly v koncentracích metabolitů vlivem aplikace rutinu

6 Diskuze

Informace týkající se metabolismu mikrobiálních metabolitů na střevním epitelu jsou do současné doby značně omezené a neexistuje o něm dostatečné množství informací. Většina studií se zabývá pouze identifikací a stanovením koncentrací vznikajících mikrobiálních metabolitů z primárních sloučenin polyfenolů s využitím vsádkové fermentace. V této diplomové práci byly ovšem již známé mikrobiální metabolity rutinu aplikovány na Caco-2 buněčnou linii, která sloužila jako *in vitro* model střevního epitelu. Kromě toho byl zkoumán ještě vliv rutinu a látek strukturně podobných mikrobiálním metabolitům rutinu. Byly pozorovány změny v metabolismu Caco-2 buněk v důsledku inkubace s 3,4-diOHPAA, 3-OHPAA, 4-OHPAA, 3-OHPPA, kvercetinem, kyselinou kávovou, dihydrokávovou a rutinem. Výsledné koncentrace byly porovnány s kontrolním vzorkem.

Výsledky výzkumu potvrzují hypotézu, že mikrobiální metabolity rutinu dokáží ovlivnit metabolismus střevních buněk. Ovšem vysvětlení, jak přesně tyto mikrobiální katabolity dokáží ovlivnit koncentrace jednotlivých vzniklých metabolitů nelze zatím ve všech případech přesně vysvětlit. Je zapotřebí dalšího výzkumu, který poslouží lepšímu porozumění.

Dle výsledků výzkumu bylo zjištěno, že inkubace Caco-2 buněk s 3,4-diOHPAA vedla ke zvýšení koncentrace formiátu. Ten v organismu vzniká dvojím způsobem. Jako vedlejší produkt anaerobní fermentace některých druhů bakterií a zároveň endogenním metabolismem serinu, glycinu, methioninu, cholinu a methanolu (Pietzke et al. 2020).

Přítomnost 3-OHPAA snížila koncentrace některých aminokyselin, přesněji isoleucinu a threoninu. Ačkoliv aminokyseliny mohou přes střevní membránu difundovat prostřednictvím vodních pórů nebo difuzních kanálů, v převážné většině jsou transportovány pomocí přenašečových systémů (Argiles & Lopez-Soriano 1990). Tudíž je možné, že 3-OHPAA dokáže zvýšit aktivitu transportních systémů pro isoleucin a threonin, které se v Caco-2 buňkách vyskytují a tím snížit jejich koncentrace v médiu v porovnání s kontrolním vzorkem. Toto tvrzení bude ovšem potřeba ještě ověřit v dalším výzkumu. Kromě toho inkubace s 3-OHPAA vedla ke snížení koncentrace methanolu, který je v těle přirozeně se vyskytující sloučeninou. V organismu může přirozeně vznikat díky metabolickým procesům zahrnující S-adenosyl methionin a fermentací střevními bakteriemi, ty se ovšem v našem střevním modelu nevyskytovaly. Mezi jeho hlavní exogenní zdroje v organismu patří ovoce, zelenina a alkohol (Dorokhov et al. 2015). Uvádí se, že při konzumaci 10-15 g pektinu, který se vyrovná 1 kg jablek/den vznikne 0,4-1,4 g methanolu. Zatímco endogenní produkcí vznikne za den přibližně 0,3-0,6 g methanolu (Lindinger 1997). Bez ohledu na jeho zdroj jsou ovšem v organismu koncentrace methanolu udržovány fyziologicky nízké, díky metabolické clearance (Dorokhov et al. 2015). A v neposlední řadě byl pozorován pokles 2-hydroxyisovalerátu a 3-hydroxyisovalerátu, což jsou organické hydroxykyseliny, které se liší způsobem vzniku. 2-hydroxyisovalerát vzniká katabolismem valinu, zatímco 3-hydroxyisovalerát vzniká katabolismem leucinu. Koncentrace těchto dvou sloučenin mohou sloužit v organismu jako biomarkery některých onemocnění (Vicente-Muñoz et al. 2015, Oh et al. 2024, OuYang et al. 2011).

U inkubace s 4-OHPAA a 3-OHPPA nebyly zaznamenány žádné statisticky významné změny v metabolismu Caco-2 buněk, které by bylo možné pozorovat v médiu. Je možné, že jejich koncentrace ve vzorcích nebyly dostatečné nebo se opravdu nepodílejí na změně v metabolismu střevních buněk.

V přítomnosti kvercetinu byla zaznamenána snížená koncentrace sukcinátu. Sukcinát vzniká v organismu hostitelskými buňkami jako intermediální metabolit cyklu trikarboxylové kyseliny produkovaný v mitochondriích nebo pomocí střevní mikrobioty mikrobiální fermentací sacharidů a aminokyselin. Nejedná se jen o pouhý vedlejší produkt některých bakterií, neboť je důležitým metabolitem křížového krmení (Fernández-Veledo & Vendrell 2019). Nicméně jeho vysoké koncentrace ve střevě jsou spojeny s narušením rovnováhy střevního mikrobiomu, jelikož sukcinát ve střevním lumen podporuje množení patogenních mikroorganismů, které využívají sukcinát jako zdroj živin (Connors et al. 2019). Dále stejně jako u 3-OHPAA byla pozorována snížená koncentrace 2-hydroxyisovalerátu ve vzorku a zaznamenány změny v koncentracích některých aminokyselin, přesněji došlo k poklesu leucinu, fenylalaninu a vzestupu asparaginu. Možné ovlivnění koncentrací aminokyselin ve vzorcích, jak už již bylo zmiňováno, může být dáno ovlivněním jejich transportních systémů na apikální straně střevních buněk.

Kromě mikrobiálních metabolitů rutinu byl dále zkoumán vliv kyseliny kávové. V důsledku její aplikace byla v médiu pozorována vyšší koncentrace acetátu, který je řazen mezi SCFA. SCFA jsou mastné kyseliny s krátkým řetězcem (méně než 6 atomů uhlíku) (Tan et al. 2014), které vznikají degradací nestravitelných polysacharidů střevní mikrobiotou (Fusco et al. 2023). Spolu s propionátem a butyrátem tvoří nejvíce zastoupené SCFA. Ty se ovšem v našich vzorcích identifikovat nepodařilo. Vliv kyseliny kávové na koncentrace acetátu zkoumala i studie Parkar et al. (2013) a potvrdila naše tvrzení. Kromě vlivu kyseliny kávové na koncentrace acetátu tato studie zkoumala i vliv rutinu, kvercetinu, kyseliny chlorogenové a inulinu na koncentrace všech tří SCFA (acetátu, propionátu a butyrátu) a došla k závěru, že všechny polyfenoly zvyšují produkci SCFA, nicméně nejvyšší změny v koncentracích jsou právě u kyseliny kávové. V našem výzkumu se ovšem zvýšení koncentrace acetátu vlivem aplikace rutinu a kvercetinu potvrdit nepodařilo.

SCFA hrají v lidském organismu nezastupitelnou roli a zastávají hned několik zásadních funkcí od ovlivnění imunitního systému po regulaci metabolických drah až po obnovu střevní bariéry (Fusco et al. 2023). Jsou významným zdrojem energie pro kolonocyty a mají vliv na pohyblivost tlustého střeva, průtok krve tlustým střevem a gastrointestinální pH. Tyto parametry významně ovlivňují absorpci a příjem elektrolytů a živin (Tazoe et al. 2008). Koncentrace SCFA přirozeně kolísají v průběhu života, což je dáno složením střevního mikrobiomu a pestrostí stravy, která ovlivňuje množství vznikajících SCFA a množství substrátu, který jsou důležitý pro vznik SCFA (Fusco et al. 2023). Nedostatek SCFA může v organismu způsobit vznik různých onemocnění. Mezi některé z nich patří například alergie, astma, autoimunitní, nádorová, metabolická a neurologická onemocnění (Tan et al. 2014). To je jeden z důvodů, proč se některé studie zabývají tím, jak by jejich koncentrace v organismu mohly zvýšit (Lee et al. 2022, Vinelli et al. 2022).

Potvrdili jsme také již známé zjištění, že kyselina kávová má vliv na střevní absorpci glukosy (Welsch et al. 1989). Ve vzorcích inkubovaných s kyselinou kávovou byly stanoveny mnohem vyšší koncentrace v porovnání s kontrolou. Je to dáno tím, že kyselina kávová

inhibuje glukosové transportéry, čímž zpomaluje absorpci glukosy Caco-2 buněčnou linií. Klíčovými transportéry glukosy ve střevě jsou SGLT1 a GLUT2 (Koepsell 2020). Kyselina kávová přesněji inhibuje sodík-dependentní transportér SGLT1, který mimo jiné může být inhibován také kyselinou chlorogenovou, ferulovou (Welsch et al. 1989) a kvercetinovými glykosidy (Cermak et al. 2004). Transport glukosy pomocí GLUT2 bývá zase inhibován myricetinem, kvercetinem a apigeninem (Johnston et al. 2005). V současné době se více než vliv konkrétních látek zkoumá účinek extraktů z ovoce a bylin bohatých na polyfenoly s možným potenciálem při léčbě diabetu mellitu 2. typu (Neagu et al. 2023, Prpa et al. 2020). Dále přítomnost kyseliny kávové ovlivnila koncentrace kyseliny p-hydroxyfenyloctové, která je hlavním mikrobiálním metabolitem flavonoidů a měla vliv na koncentrace aminokyselin, kdy pravděpodobně inhibovala transportér pro histidin na apikální straně Caco-2 buněk a tím mohla zvýšit jeho koncentrace v médiu. Na druhou stranu pravděpodobně zvýšila přenos methioninu a tím jeho koncentraci ve vzorku snížila. Výzkum přenašečových systémů aminokyselin ve střevním epitelu je značně obtížný, vzhledem k tomu, že existuje mnoho transportních systémů s překrývajícími se specifiky. Nicméně se uvádí, že během několika posledních desetiletích se podařilo úspěšně identifikovat většinu epiteliálních transportérů aminokyselin (Bröer 2008).

Přítomnost kyseliny dihydrokávové stejně jako 3,4-diOHPAA vedla ke zvýšení koncentrace formiátu a k tomu ještě kyseliny 3-hydroxyfenyloctové, která se řadí mezi mikrobiální katabolity rutinu. Možné mechanismy vzestupu nejsou do současné doby známy. Dále snížila koncentrace fumarátu, který patří mezi metabolity citrátového cyklu. V organismu vzniká dehydrogenací sukcinátu a je přeměňován na malát. Zároveň vzniká katabolismem některých aminokyselin a při detoxikaci amoniaku v močovinovém cyklu (Chandel 2021). Fumarát je řazen mezi onkometabolity. Studie Zheng et al. (2013) uvádí, že jeho akumulace v buňkách je zpravidla způsobena deficitem fumaráthydratázy a je spojena s výskytem leiomyomatózy a rakoviny ledvin.

Přítomnost rutinu vedla ke zvýšení koncentrace myo-inositolu, což je cukerný alkohol, který má podobnou strukturu s glukosou a je v nízkých koncentracích běžně zastoupen v mnoha potravinách. Uvádí se, že myo-inositol má vliv na aktivaci glukosových transportérů a jejího využití (Chukwuma et al. 2016). Některé studie uvádí, že suplementace myo-inositolu má vliv na metabolismus lipidů a glukosy, proto se jeví jako vhodné nutriční doplňkové činidlo u diabetu mellitu 2. typu (Yap et al. 2007, Maeba et al. 2008). Nicméně v tomto výzkumu žádný statisticky významný vliv na metabolismus glukosy nebyl pozorován. Kromě myo-inositolu měla inkubace s rutinem dále vliv i na koncentrace asparaginu stejně jako kvercetin.

7 Závěr

Na základě výsledků této diplomové práce lze konstatovat, že rutin, mikrobiální metabolity rutinu a jim strukturně podobné metabolity dokáží ovlivnit metabolismus střevních epitelálních buněk. Změny v metabolismu Caco-2 buněčné linie jsou natolik patrné, že lze potvrdit hypotézu diplomové práce.

Ve vzorcích média Caco-2 buněk bylo kvantifikováno celkem 31 metabolitů. U 18 z nich byly pozorovány statisticky významné změny v koncentracích v důsledku aplikace příslušných látek. Metabolismus Caco-2 buněk byl nejvíce ovlivněn vlivem inkubace s kvercetinem, 3-OHPAA a kyselinou kávovou, přičemž každý z těchto katabolitů ovlivnil koncentrace pěti vzniklých metabolitů. Kyselina dihydrokávová ovlivnila koncentrace tři vzniklých metabolitů, rutin dvou a 3,4-diOHPAA jednoho. U 4-OHPAA a 3-OHPPA nebyly zaznamenány žádné statisticky významné změny v koncentracích metabolitů. Tyto poznatky přispívají k hlubšímu porozumění střevního metabolismu, mikrobiálním metabolitům polyfenolů a jejich vlivu na organismus člověka.

Dále je důležité poznamenat, že výzkum vlivu mikrobiálních metabolitů na epitel střevních buněk touto závěrečnou prací nekončí. Stále existuje mnoho otázek, které je třeba zodpovědět. Dalším krokem k porozumění metabolismu rutinu a jeho interakce se střevními buňkami bude metabolomická analýza extraktů Caco-2 buněčné linie a stanovení transportu mikrobiálních metabolitů rutinu přes střevní buňky. Očekává se, že tím dojde k rozšíření našich poznatků a objasnění otázek, jež vzešly z této diplomové práce.

8 Literatura

- Abhyankar N, Szalai V. 2021. Challenges and Advances in the Application of Dynamic Nuclear Polarization to Liquid-State NMR Spectroscopy. *The journal of physical chemistry* **125**:5171–5190.
- Aherne SA, O'Brien NM. 2002. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition* **18**:75–81.
- Akbari A, Lavasanifar A, Wu J. 2017. Interaction of cruciferin-based nanoparticles with Caco-2 cells and Caco-2/HT29-MTX co-cultures. *Acta Biomaterialia* **64**:249–258.
- Alarcon-Barrera JC, Kostidis S, Ondo-Mendez A, Giera M. 2022. Recent advances in metabolomics analysis for early drug development. *Drug Discovery Today* **27**:1763–1773.
- Alminger M et al. 2014. In Vitro Models for Studying Secondary Plant Metabolite Digestion and Bioaccessibility. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **13**:413–436.
- Amaretti A, Raimondi S, Leonardi A, Quartieri A, Rossi M. 2015. Hydrolysis of the rutinose-conjugates flavonoids rutin and hesperidin by the gut microbiota and bifidobacteria. *Nutrients* **7**:2788–2800.
- Angioni S, Congiu F, Vitale SG, D'Alterio MN, Noto A, Monni G, Santoru ML, Fanos V, Murgia F, Atzori L. 2023. Gas Chromatography–Mass Spectrometry. Metabolites Analysis in Endometriosis Patients: A Prospective Observational Translational Study. *Journal of Clinical Medicine* **12**.
- Argiles JM, Lopez-Soriano FJ. 1990. Intestinal amino acid transport: An overview. *International Journal of Biochemistry* **22**:931–937.
- Arumugam M et al. 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **473**:174–180.
- Babazadeh A, Ghanbarzadeh B, Hamishehkar H. 2016. Novel nanostructured lipid carriers as a promising food grade delivery system for rutin. *Journal of Functional Foods* **26**:167–175.
- Balmer SE, Wharton BA. 1989. Diet and faecal flora in the newborn: breast milk and infant formula. *Archives of disease in childhood* **64**:1672–1677.
- Bang SH, Hyun YJ, Shim J, Hong SW. 2015. Metabolism of Rutin and Poncirin by Human Intestinal Microbiota and Cloning of Their Metabolizing α -L-Rhamnosidase from *Bifidobacterium dentium*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **25**:18–25.

- Bartle KD, Myers P. 2002. History of gas chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **21**:547–557.
- Baumgertel A, Grimm R, Eisenbeiß W, Kreis W. 2003. Purification and characterization of a flavonol 3-O- β -heterodisaccharidase from the dried herb of *Fagopyrum esculentum* Moench. *Phytochemistry* **64**: 411–418.
- Beckonert O, Keun HC, Ebbels TMD, Bundy J, Holmes E, Lindon JC, Nicholson JK. 2007. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nature Protocols* **2**:2692–2703.
- Beekwilder J, Marcozzi D, Vecchi S, de Vos R, Janssen P, Francke C, van Hylekama Vlieg J, Hall RD. 2009. Characterization of Rhamnosidases from *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and environmental microbiology* **75**:3447–3454.
- Belenky P et al. 2015. Bactericidal antibiotics induce toxic metabolic perturbations that lead to cellular damage. *Cell reports* **13**:968-980.
- Bertini I, Hu X, Luchinat C. 2014. Global metabolomics characterization of bacteria: pre-analytical treatments and profiling. *Metabolomics* **10**:241–249.
- Bi Y, Ajoolabady A, Demillard LJ, Yu W, Hilaire ML, Zhang Y, Ren J. 2021. Dysregulation of iron metabolism in cardiovascular diseases: From iron deficiency to iron overload. *Biochemical Pharmacology* **190**:114661.
- Bokkenheuser VD, Shackleton CH, Winter J. 1987. Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal Bacteroides from humans. *Biochemical Journal* **248**:953–956.
- Bonechi C, Donati A, Tamasi G, Leone G, Consumi M, Rossi C, Lamponi S, Magnani A. 2018. Protective effect of quercetin and rutin encapsulated liposomes on induced oxidative stress. *Biophysical Chemistry* **233**:55–63.
- Boyuklieva R, Zagorchev P, Pilicheva B. 2023. Computational, *In Vitro*, and *In Vivo* Models for Nose-to-Brain Drug Delivery Studies. *Biomedicines* **11**:2198.
- Bragg F, Trichia E, Aguilar-Ramirez D, Bešević J, Lewington S, Emberson J. 2022. Predictive value of circulating NMR metabolic biomarkers for type 2 diabetes risk in the UK Biobank study. *BMC Medicine* **20**:159.
- Braune A, Blaut M. 2016. Bacterial species involved in the conversion of dietary flavonoids in the human gut. *Gut microbes* **7**:216–234.

- Braune A, Gütschow M, Engst W, Blaut M. 2001. Degradation of Quercetin and Luteolin by *Eubacterium ramulus*. *Applied and Environmental Microbiology* **67**:5558–5567.
- Bröer S. 2008. Amino Acid Transport Across Mammalian Intestinal and Renal Epithelia. *Physiological Reviews* **88**:249–286.
- Burgdorf KS et al. 2010. Studies of association between *LPINI* variants and common metabolic phenotypes among 17538 Danes. *European Journal of Endocrinology* **163**:81–87.
- Campbell CG. 1997 Buckwheat *Fagopyrum esculentum* Moench. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops, vol. 19 IPK, IPGRI, Germany, Rome, Italy.
- Caparica R, Júlio A, Araújo MEM, Baby AR, Fonte P, Costa JG, Santos de Almeida T. 2020. Anticancer Activity of Rutin and Its Combination with Ionic Liquids on Renal Cells. *Biomolecules* **10**:233.
- Cardona F, Andrés-Lacueva C, Tulipani S, Tinahones FJ, Queipo-Ortuño MI. 2013. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **24**:1415–1422.
- Carreras HZ. 2021. NMR Spectroscopy Principles, Interpreting an NMR Spectrum and Common Problems. Technology Networks. Available from: <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/nmr-spectroscopy-principles-interpreting-an-nmr-spectrum-and-common-problems-355891> (accessed November 2023).
- Cermak R, Landgraf S, Wolfram S. 2004. Quercetin glucosides inhibit glucose uptake into brush-border-membrane vesicles of porcine jejunum. *British Journal of Nutrition* **91**:849–855.
- Cervantes-Laurean D, Schramm DD, Jacobson EL, Halaweish I, Bruckner GG, Boissonneault GA. 2006. Inhibition of advanced glycation end product formation on collagen by rutin and its metabolites. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **17**:531–540.
- Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R. 2012. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell* **148**:1258–1270.
- Connors J, Dawe N, Van Limbergen J. 2019. The Role of Succinate in the Regulation of Intestinal Inflammation. *Nutrients* **11**:25.

- Covington BC, McLean JA, Bachmann BO. 2017. Comparative mass spectrometry-based metabolomics strategies for the investigation of microbial secondary metabolites. *Natural Product Reports* **34**:6–24.
- Cresci GA, Bawden E. 2015. Gut Microbiome: What We Do and Don't Know. Nutrition in clinical practice: official publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition **30**:734–746.
- Cresci GAM, Izzo K. 2019. Chapter 4 - Gut Microbiome. Pages 45-54 in Corrigan ML, Roberts K, Steiger E. *Adult Short Bowel Syndrome*. Academic Press.
- David LA et al. 2014. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* **505**:559–563.
- Dimitrieska-Stojković E, Zdravkovski Z. 2003. Supercritical Fluid Extraction of Quercetin and Rutin from *Hyperici* Herba. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **26**:2517–2533.
- Ding X, Hu X, Chen Y, Xie J, Ying M, Wang Y, Yu Q. 2021. Differentiated Caco-2 cell models in food-intestine interaction study: Current applications and future trends. *Trends in Food Science & Technology* **107**:455–465.
- Dolara P, Luceri C, Filippo C, Femia A, Giovannelli L, Caderni G, Cecchini C, Silvi S, Orpianesi C, Cresci A. 2005. Red wine polyphenols influence carcinogenesis, intestinal microflora, oxidative damage and gene expression profiles of colonic mucosa in F344 rats. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **591**:237–246.
- Dorokhov YL, Shindyapina AV, Sheshukova EV, Komarova TV. 2015. Metabolic methanol: molecular pathways and physiological roles. *Physiological reviews* **95**:603-644.
- Dostal A, Gagnon M, Chassard C, Zimmermann MB, O'Mahony L, Lacroix C. 2014. *Salmonella* adhesion, invasion and cellular immune responses are differentially affected by iron concentrations in a combined in vitro gut fermentation-cell model. *PloS one* (e93549). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093549>
- Drouin N, Pezzatti J, Gagnebin Y, González-Ruiz V, Schappler J, Rudaz S. 2018. Effective mobility as a robust criterion for compound annotation and identification in metabolomics: Toward a mobility-based library. *Analytica Chimica Acta* **1032**:178–187.
- Dunn WB, Ellis DI. 2005. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **24**:285–294.

- Dupont D et al. 2019. Can dynamic in vitro digestion systems mimic the physiological reality? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **59**:1546–1562.
- Eid N, Enani S, Walton G, Corona G, Costabile A, Gibson G, Rowland I, Spencer JP. 2014. The impact of date palm fruits and their component polyphenols, on gut microbial ecology, bacterial metabolites and colon cancer cell proliferation. *Journal of nutritional science* (e46). <https://doi.org/10.1017/jns.2014.16>
- Emwas AH, Al-Talla Z, Yang Y, Kharbatia N. 2015. Gas Chromatography–Mass Spectrometry of Biofluids and Extracts. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), **1277**:91–112.
- Emwas AHM, Salek RM, Griffin JL, Merzaban J. 2013. NMR-based metabolomics in human disease diagnosis: applications, limitations, and recommendations. *Metabolomics* **9**:1048–1072.
- Enogieru AB, Haylett W, Hiss DC, Bardien S, Ekpo OE. 2018. Rutin as a Potent Antioxidant: Implications for Neurodegenerative Disorders. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (e6241017). <https://doi.org/10.1155/2018/6241017>
- Erez A, DeBerardinis RJ. 2015. Metabolic dysregulation in monogenic disorders and cancer — finding method in madness. *Nature Reviews Cancer* **15**:440–448.
- Faithi AF, Delazar A, Amiri R. 2006. Extraction of flavonoids and quantification of rutin from waste tobacco leaves. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* **3**:222-227.
- Fernández-Veledo S, Vendrell J. 2019. Gut microbiota-derived succinate: Friend or foe in human metabolic diseases? *Rev Endocr Metab Disord* **20**:439–447.
- Ferrua MJ, Singh RP. 2010. Modeling the Fluid Dynamics in a Human Stomach to Gain Insight of Food Digestion. *Journal of Food Science* **75**:151–162.
- Fiehn O, Garvey WT, Newman JW, Lok KH, Hoppel CL, Adams SH. 2010. Plasma metabolomic profiles reflective of glucose homeostasis in non-diabetic and type 2 diabetic obese African-American women. *PloS one* (e15234). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015234>
- Fiehn O. 2002. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology* **48**:155–171.
- Finegold SM et al. 2010. Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children. *Anaerobe* **16**:444–453.

- Finegold SM, Downes J, Summanen PH. 2012. Microbiology of regressive autism. *Anaerobe* **18**:260–262.
- Fleet JC, Wang L, Vitek O, Craig BA, Edenberg HJ. 2003. Gene expression profiling of Caco-2 BBe cells suggests a role for specific signaling pathways during intestinal differentiation. *Physiological Genomics* **13**:57–68.
- Fogh J, Wright WC, Loveless JD. 1977. Absence of HeLa Cell Contamination in 169 Cell Lines Derived From Human Tumors. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **58**:209–214.
- Förster J, Famili I, Fu P, Palsson BØ, Nielsen J. 2003. Genome-scale reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* metabolic network. *Genome research* **13**:244–253.
- Frutos MJ, Rincón-Frutos L, Valero-Cases E. 2019. Chapter 2.14 - Rutin. Pages 111-117 in Nabavi SM, Silva AS (Eds.). *Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements*. Academic Press.
- Fusco W et al. 2023. Short-Chain Fatty-Acid-Producing Bacteria: Key Components of the Human Gut Microbiota. *Nutrients* **15**:2211.
- Gade A, Kumar MS. 2023. Gut microbial metabolites of dietary polyphenols and their potential role in human health and diseases. *Journal of Physiology and Biochemistry* **79**:695–718.
- Gan LS, Eads C, Niederer T, Bridgers A, Yanni S, Hsyu PH, Pritchard FJ, Thakker D. 1994. Use of CACO-2 Cells as an in vitro Intestinal Absorption and Metabolism Model. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **20**:615–631.
- Ganesan D, Albert A, Paul E, Ananthapadmanabhan K, Andiappan R, Sadasivam SG. 2020. Rutin ameliorates metabolic acidosis and fibrosis in alloxan induced diabetic nephropathy and cardiomyopathy in experimental rats. *Molecular and Cellular Biochemistry* **471**:41–50.
- Ganeshpurkar A, Saluja AK. 2017. The Pharmacological Potential of Rutin. *Saudi Pharmaceutical Journal* **25**:149–164.
- Garcia-Simon M, Morales JM, Modesto-Alapont V, Gonzalez-Marrachelli V, Vento-Rehues R, Jorda-Miñana A, Blanquer-Olivas J, Monleon D. 2015. Prognosis Biomarkers of Severe Sepsis and Septic Shock by 1H NMR Urine Metabolomics in the Intensive Care Unit. *PLOS ONE* (e0140993). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140993>
- Genzel Y. 2015. Designing cell lines for viral vaccine production: Where do we stand? *Biotechnology Journal* **10**:728–740.

- Ghorbani A. 2017. Mechanisms of antidiabetic effects of flavonoid rutin. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **96**:305–312.
- Guerra A, Etienne-Mesmin L, Livrelli V, Denis S, Blanquet-Diot S, Alric M. 2012. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in Biotechnology* **30**:591–600.
- Guo J, Wu Y, Jiang M, Wu C, Wang G. 2022. An LC–MS-based metabolomic approach provides insights into the metabolite profiles of *Ginkgo biloba* at different developmental stages and in various organs. *Food Research International* **159**:111644.
- Gutmann H, Fricker G, Török M, Michael S, Beglinger C, Drewe J. 1999. Evidence for Different ABC-Transporters in Caco-2 Cells Modulating Drug Uptake. *Pharmaceutical Research* **16**:402–407.
- Halket JM, Waterman D, Przyborowska AM, Patel RKP, Fraser PD, Bramley PM. 2005. Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS. *Journal of Experimental Botany* **56**:219–243.
- Harlina PW, Maritha V, Musfiroh I, Huda S, Sukri N, Muchtaridi M. 2022. Possibilities of Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS)-Based Metabolomics and Lipidomics in the Authentication of Meat Products: A Mini Review. *Food Sci Anim Resour* **42**:744-761.
- Harrigan GG, Goodacre R. 2003. *Metabolic profiling: its role in biomarker discovery and gene function analysis*, Kluwer Academic Publishers, London.
- Hatzakis E. 2019. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy in Food Science: A Comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **18**:189–220.
- Havlik J, Marinello V, Gardyne A, Hou M, Mullen W, Morrison DJ, Preston T, Combet E, Edwards CA. 2020. Dietary Fibres Differentially Impact on the Production of Phenolic Acids from Rutin in an In Vitro Fermentation Model of the Human Gut Microbiota. *Nutrients* **12**:1577.
- Hoffmann E, Stroobant V. 2007. *Mass spectrometry: principles and applications*. John Wiley & Sons.
- Hosseinzadeh H, Nassiri-Asl M. 2014. Review of the protective effects of rutin on the metabolic function as an important dietary flavonoid. *Journal of Endocrinological Investigation* **37**:783–788.

- Chahyadi A, Elfahmi. 2020. The influence of extraction methods on rutin yield of cassava leaves (*Manihot esculenta* Crantz). Saudi Pharmaceutical Journal **28**:1466–1473.
- Chandel NS. 2021. Amino Acid Metabolism. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology **13**.
- Chen C, Gonzalez FJ, Idle JR. 2007. LC-MS-Based Metabolomics in Drug Metabolism. Drug Metabolism Reviews **39**:581–597.
- Chen H, Miao Q, Geng M, Liu J, Hu Y, Tian L, Pan J, Yang Y. 2013. Anti-tumor effect of rutin on human neuroblastoma cell lines through inducing G2/M cell cycle arrest and promoting apoptosis. TheScientificWorldJournal (e269165). <https://doi.org/10.1155/2013/269165>
- Chen XM, Elisia I, Kitts DD. 2010. Defining conditions for the co-culture of Caco-2 and HT29-MTX cells using Taguchi design. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods **61**:334–342.
- Chielle EO, Bonfanti G, de Bona KS, Cargnelutti LO, Bitencourt PER, da Silva PS, Campos MMA, Moretto MB. 2016. Rutin restores adenosine deaminase activity in serum and the liver and improves biochemical parameters in streptozotocin-induced diabetic rats **18**:273–278.
- Chua LS. 2013. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. Journal of Ethnopharmacology **150**:805–817.
- Chukwuma CI, Ibrahim MA, Islam MS. 2016. Myo-inositol inhibits intestinal glucose absorption and promotes muscle glucose uptake: a dual approach study. J Physiol Biochem **72**:791–801.
- Ibrahim R, Kasabri V, Sunoqrot S, Shalabi D, Alkhateeb R, Alhiari Y. 2023. Preparation and Characterization of Rutin-Encapsulated Polymeric Micelles and Studies of Synergism with Bioactive Benzoic Acids and Triazolofluoroquinolones as Anticancer Nanomedicines. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention **24**:977–989.
- Inal M, Altinişik M, Bilgin MD. 2002. The effect of quercetin on renal ischemia and reperfusion injury in the rat. Cell Biochemistry and Function **20**:291–296.
- Jakobsson HE, Abrahamsson TR, Jenmalm MC, Harris K, Quince C, Jernberg C, Björkstén B, Engstrand L, Andersson AF. 2014. Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by Caesarean section. Gut **63**:559.

- Jernberg C, Löfmark S, Edlund C, Jansson JK. 2007. Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *The ISME Journal* **1**:56–66.
- Ji H, Hu J, Zuo S, Zhang S, Li M, Nie S. 2022. In vitro gastrointestinal digestion and fermentation models and their applications in food carbohydrates. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **62**:5349–5371.
- Jie Z et al. 2017. The gut microbiome in atherosclerotic cardiovascular disease. *Nature communications* **8**:845.
- Johnson CH, Ivanisevic J, Siuzdak G. 2016. Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nature reviews. Molecular cell biology* **17**:451–459.
- Johnson CH, Patterson AD, Idle JR, Gonzalez FJ. 2012. Xenobiotic metabolomics: major impact on the metabolome. *Annual review of pharmacology and toxicology* **52**:37–56.
- Johnston K, Sharp P, Clifford M, Morgan L. 2005. Dietary polyphenols decrease glucose uptake by human intestinal Caco-2 cells. *FEBS Letters* **579**:1653–1657.
- Kailasam S. 2021. LC-MS – What Is LC-MS, LC-MS Analysis and LC-MS/MS. *Technology Networks*. (Available from: <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/lc-ms-what-is-lc-ms-lc-ms-analysis-and-lc-msms-348238>) (October 2023).
- Kalinová J, Dadakova E. 2004. Varietal differences of rutin in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) determined by micellar electrokinetic capillary chromatography. Pages 719-722 in *Advances in Buckwheat Research*.
- Kaur G, Dufour JM. 2012. Cell lines: Valuable tools or useless artifacts. *Spermatogenesis* **2**:1–5.
- Kelly RT, Wang C, Rausch SJ, Lee CS, Tang K. 2014. Pneumatic microvalve-based hydrodynamic sample injection for high-throughput, quantitative zone electrophoresis in capillaries. *Analytical chemistry* **86**:6723–6729.
- Kim H, Kong H, Choi B, Yang Y, Kim Y, Lim MJ, Neckers L, Jung Y. 2005. Metabolic and Pharmacological Properties of Rutin, a Dietary Quercetin Glycoside, for Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *Pharmaceutical Research* **22**:1499–1509.
- Kim HK, Choi YH, Verpoorte R. 2010. NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nature Protocols* **5**:536–549.
- Kimira M, Arai Y, Shimoi K, Watanabe S. 1998. Japanese Intake of Flavonoids and Isoflavonoids from Foods. *Journal of Epidemiology* **8**:168–175.

- Klünemann M et al. 2021. Bioaccumulation of therapeutic drugs by human gut bacteria. *Nature* **597**:533–538.
- Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, Angenent LT, Ley RE. 2011. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**:4578–4585.
- Koepsell H. 2020. Glucose transporters in the small intestine in health and disease. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* **472**:1207–1248.
- Konecni K, Low NH, Nickerson MT. 2012. Chitosan–tripolyphosphate submicron particles as the carrier of entrapped rutin. *Food Chemistry* **134**:1775–1779.
- Kong F, Singh RP. 2008. Disintegration of Solid Foods in Human Stomach. *Journal of Food Science* **73**:67–80.
- Kostidis S, Addie RD, Morreau H, Mayboroda OA, Giera M. 2017. Quantitative NMR analysis of intra- and extracellular metabolism of mammalian cells: A tutorial. *Analytica Chimica Acta* **980**:1–24.
- Kreft S, Knapp M, Kreft I. 1999. Extraction of Rutin from Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) Seeds and Determination by Capillary Electrophoresis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**:4649–4652.
- Krumsiek J et al. 2012. Mining the unknown: a systems approach to metabolite identification combining genetic and metabolic information. *PLoS genetics* (e1003005). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003005>
- Kunert R, Reinhart D. 2016. Advances in recombinant antibody manufacturing. *Applied Microbiology and Biotechnology* **100**:3451–3461.
- Labib S, Erb A, Kraus M, Wickert T, Richling E. 2004. The pig caecum model: A suitable tool to study the intestinal metabolism of flavonoids. *Molecular Nutrition & Food Research* **48**:326–332.
- Lambert JB, Mazzola EP, Ridge CD. 2019. Nuclear magnetic resonance spectroscopy: an introduction to principles, applications, and experimental methods. John Wiley & Sons.
- Lampen A, Ebert B, Stumkat L, Jacob J, Seidel A. 2004. Induction of gene expression of xenobiotic metabolism enzymes and ABC-transport proteins by PAH and a reconstituted PAH mixture in human Caco-2 cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* **1681**:38–46.

- Larive CK, Barding GA Jr, Dinges MM. 2015. NMR Spectroscopy for Metabolomics and Metabolic Profiling. *Analytical Chemistry* **87**:133–146.
- Larrosa M, Yañez-Gascón MJ, Selma MV, González-Sarriás A, Toti S, Cerón JJ, Tomás-Barberán F, Dolara P, Espín JC. 2009. Effect of a Low Dose of Dietary Resveratrol on Colon Microbiota, Inflammation and Tissue Damage in a DSS-Induced Colitis Rat Model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**:2211–2220.
- Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FWJ, Nielsen DS, Andreasen AS, Pedersen BK, Al-Soud WA, Sørensen SJ, Hansen LH, Jakobsen M. 2010. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PloS One* (e9085). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009085>
- Lea T. 2015. Caco-2 Cell Line. Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models. Pages 103-111 in Springer International Publishing.
- Lee JG, Lee J, Lee A, Jo SV, Park CH, Han DS, Eun CS. 2022. Impact of short-chain fatty acid supplementation on gut inflammation and microbiota composition in a murine colitis model. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **101**:108926.
- Lee HC, Jenner AM, Low CS, Lee YK. 2006. Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Research in Microbiology* **157**: 876–884.
- Lindinger W, Taucher J, Jordan A, Hansel A, Vogel W. 1997, Endogenous Production of Methanol after the Consumption of Fruit. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* **21**:939-943.
- Liu JX, Aerts JT, Rubakhin SS, Zhang XX, Sweedler JV. 2014. Analysis of endogenous nucleotides by single cell capillary electrophoresis-mass spectrometry. *The Analyst* **139**:5835–5842.
- Liu W, Ye A, Han F, Han J. 2019. Advances and challenges in liposome digestion: Surface interaction, biological fate, and GIT modeling. *Advances in Colloid and Interface Science* **263**:52–67.
- Lobritz MA, Belenky P, Porter CBM, Gutierrez A, Yang JH, Schwarz EG, Dwyer DJ, Khalil AS, Collins JJ. 2015. Antibiotic efficacy is linked to bacterial cellular respiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**:8173–8180.
- Macedo MH, Baião A, Pinto S, Barros AS, Almeida H, Almeida A, das Neves J, Sarmiento B. 2021. Mucus-producing 3D cell culture models. *Advanced Drug Delivery Reviews* **178**:113993.

- Maeba R, Hara H, Ishikawa H, Hayashi S, Yoshimura N, Kusano J, Takeoka Y, Yasuda D, Okasaki T, Kinoshita M, Teramoto T. 2008. Myo-Inositol Treatment Increases Serum Plasmalogens and Decreases Small Dense LDL, Particularly in Hyperlipidemic Subjects with Metabolic Syndrome. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* **54**:196–202.
- Mamani-Matsuda M, Kauss T, Al-Kharrat A, Rambert J, Fawaz F, Thiolat D, Moynet D, Coves S, Malvy D, Mossalayi MD. 2006. Therapeutic and preventive properties of quercetin in experimental arthritis correlate with decreased macrophage inflammatory mediators. *Biochemical Pharmacology* **72**:1304–1310.
- Manach C, Morand C, Demigné C, Texier O, Régéat F, Rémésy C. 1997. Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *FEBS Letters* **409**:12–16.
- Marquez B, Bambeke F. 2011. ABC multidrug transporters: target for modulation of drug pharmacokinetics and drug-drug interactions,” *Current Drug Targets* **12**:600–620.
- Masters JRW. 2000. Human cancer cell lines: fact and fantasy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **1**:233–236.
- McMaster MC. 2005. LC/MS: a practical user's guide. John Wiley & Sons.
- Meyer M, Fabjanowicz M, Mamani-Huanca M, López-González Á, Płotka-Wasyłka J, Ramautar R. 2022. Profiling of polar ionogenic metabolites in Polish wines by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *ELECTROPHORESIS* **43**:1814–1821.
- Mi K, Jiang Y, Chen JD, Qian Z, Sun H, Shang D. 2020. Construction and Analysis of Human Diseases and Metabolites Network. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* **8**:398.
- Michalkiewicz A, Biesaga M, Pyrzyńska K. 2008. Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey. *Journal of Chromatography A* **1187**:18–24.
- Ming X, Stein TP, Barnes V, Rhodes N, Guo L. 2012. Metabolic Perturbance in Autism Spectrum Disorders: A Metabolomics Study. *Journal of Proteome Research* **11**:5856–5862.
- Mischak-Weissinger E, Mischak H. 2004. Proteom Analysis Applied Towards Early Diagnosis of Renal Diseases and Transplant-Monitoring. *Transplantationsmedizin* **16**.
- Monks A et al. 1991. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **83**:757–766.

- Morvan D, Demidem A. 2007. Metabolomics by Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of the Response to Chloroethylnitrosourea Reveals Drug Efficacy and Tumor Adaptive Metabolic Pathways. *Cancer Research* **67**:2150–2159.
- Murota K, Shimizu S, Chujo H, Moon JH, Terao J. 2000. Efficiency of Absorption and Metabolic Conversion of Quercetin and Its Glucosides in Human Intestinal Cell Line Caco-2. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **384**:391–397.
- Muthubharathi BC, Gowripriya T, Balamurugan K. 2021. Metabolomics: small molecules that matter more. *Molecular Omics* **17**:210–229.
- Nam HK, Hong SH, Shin KC, Oh DK. 2012. Quercetin production from rutin by a thermostable β -rutinosidase from *Pyrococcus furiosus*. *Biotechnology Letters* **34**: 483-489.
- Neagu E, Paun G, Albu C, Eremia SA-MV, Radu GL. 2023. *Artemisia abrotanum* and *Symphytum officinale* Polyphenolic Compounds-Rich Extracts with Potential Application in Diabetes Management. *Metabolites* **13**:354.
- Negahdari R, Bohlouli S, Sharifi S, Maleki Dizaj S, Rahbar Saadat Y, Khezri K, Jafari S, Ahmadian E, Gorbani Jahandizi N, Raeesi S. 2021. Therapeutic benefits of rutin and its nanoformulations. *Phytotherapy Research* **35**:1719–1738.
- Nemet I et al. 2020. A Cardiovascular Disease-Linked Gut Microbial Metabolite Acts via Adrenergic Receptors. *Cell* **180**:862–877.
- Niessen WM. 2001. Current practice of gas chromatography-mass spectrometry. CRC Press.
- Nissen L, Casciano F, Gianotti A. 2020. Intestinal fermentation in vitro models to study food-induced gut microbiota shift: an updated review. *FEMS Microbiology Letters* **367**.
- Oboh G, Adebayo AA, Ademosun AO, Olowokere OG. 2020. Rutin restores neurobehavioral deficits via alterations in cadmium bioavailability in the brain of rats exposed to cadmium. *NeuroToxicology* **77**:12–19.
- Oh J, Kim J, Lee S, Park G, Baritugo K-AG, Han KJ, Lee S, Sung G-H. 2024. ^1H NMR Serum Metabolomic Change of Trimethylamine N-oxide (TMAO) Is Associated with Alcoholic Liver Disease Progression. *Metabolites* **14**:39.
- Oliver SG, Winson MK, Kell DB, Baganz F. 1998. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends in Biotechnology* **16**:373–378.
- Oto J, Fernández-Pardo Á, Roca M, Plana E, Cana F, Herranz R, Pérez-Ardavín J, Vera-Donoso CD, Martínez-Sarmiento M, Medina P. 2022. LC–MS metabolomics of urine

reveals distinct profiles for non-muscle-invasive and muscle-invasive bladder cancer. *World Journal of Urology* **40**:2387–2398.

- Ouwehand A, Isolauri E, Salminen S. 2002. The role of the intestinal microflora for the development of the immune system in early childhood. *European Journal of Nutrition* **41**:32–37.
- OuYang D, Xu J, Huang H, Chen Z. 2011. Metabolomic Profiling of Serum from Human Pancreatic Cancer Patients Using ¹H NMR Spectroscopy and Principal Component Analysis. *Appl Biochem Biotechnol* **165**:148–154.
- Paige LA, Mitchell MW, Krishnan KRR, Kaddurah-Daouk R, Steffens DC. 2007. A preliminary metabolomic analysis of older adults with and without depression. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* **22**:418-423.
- Palama TL, Canard I, Rautureau GJP, Mirande C, Chatellier S, Elena-Herrmann B. 2016. Identification of bacterial species by untargeted NMR spectroscopy of the: Exo - metabolome. *Analyst* **141**:4558–4561.
- Pan Y, Cheng JH, Sun DW. 2021. Metabolomic analyses on microbial primary and secondary oxidative stress responses. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **20**:5675–5697.
- Panse N, Gerk PM. 2022. The Caco-2 Model: Modifications and enhancements to improve efficiency and predictive performance. *International Journal of Pharmaceutics* **624**:122004.
- Park B, Changl K, Park C. 2004. Comparison in Rutin Content in Seed and Plant of Tartary Buckwheat (*Fagopyrum tataricum*). *Korean Journal of Plant Resources* **18**.
- Park SN, Lee MH, Kim SJ, Yu ER. 2013. Preparation of quercetin and rutin-loaded ceramide liposomes and drug-releasing effect in liposome-in-hydrogel complex system. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **435**:361–366.
- Parkar SG, Stevenson DE, Skinner MA. 2008. The potential influence of fruit polyphenols on colonic microflora and human gut health. *International Journal of Food Microbiology* **124**:295–298.
- Parkar SG, Trower TM, Stevenson DE. 2013. Fecal microbial metabolism of polyphenols and its effects on human gut microbiota. *Anaerobe* **23**:12–19.
- Pedriali CA, Fernandes AU, Bernusso L de C, Polakiewicz B. 2008. The synthesis of a water-soluble derivative of rutin as an antiradical agent. *Química Nova* **31**:2147–2151.

- Pietzke M, Meiser J, Vazquez A. 2020. Formate metabolism in health and disease. *Molecular Metabolism* **33**:23–37.
- Pont L, Compte I, Sanz-Nebot V, Barbosa J, Benavente F. 2020. Analysis of Hordeins in Barley Grain and Malt by Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry. *Food Analytical Methods* **13**:325–336.
- Prpa E, Corpe C, Hall W. 2020. Acute effects of apple extracts with different polyphenol compositions on glucose transport in human intestinal cell line Caco-2/TC7. *Proceedings of the Nutrition Society* (e367). <https://doi.org/10.1017/S0029665120003158>
- Qin J et al. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**:59–65.
- Queipo-Ortuño MI, Boto-Ordóñez M, Murri M, Gomez-Zumaquero JM, Clemente-Postigo M, Estruch R, Cardona Diaz F, Andrés-Lacueva C, Tinahones FJ. 2012. Influence of red wine polyphenols and ethanol on the gut microbiota ecology and biochemical biomarkers. *The American Journal of Clinical Nutrition* **95**:1323–1334.
- Raamsdonk LM et al. 2001. A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. *Nature Biotechnology* **19**:45–50.
- Ramautar R, Shyti R, Schoenmaker B, de Groote L, Derks RJE, Ferrari MD, van den Maagdenberg AMJM, Deelder AM, Mayboroda OA. 2012. Metabolic profiling of mouse cerebrospinal fluid by sheathless CE-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **404**:2895–2900.
- Ramautar R, Somsen GW, de Jong GJ. 2009. CE-MS in metabolomics. *ELECTROPHORESIS* **30**:276–291.
- Ramautar R. 2016. CE-MS in metabolomics: status quo and the way forward. *Bioanalysis* **8**:371–374.
- Ravi GS, Charyulu RN, Dubey A, Prabhu P, Hebbar S, Mathias AC. 2018. Nano-lipid Complex of Rutin: Development, Characterisation and *In Vivo* Investigation of Hepatoprotective, Antioxidant Activity and Bioavailability Study in Rats. *AAPS PharmSciTech* **19**:3631–3649.
- Reale O, Huguet A, Fessard, V. 2021. Co-culture model of Caco-2/HT29-MTX cells: A promising tool for investigation of phycotoxins toxicity on the intestinal barrier. *Chemosphere* **273**:128497.

- Reuhs BL, Simsek S. 2017. Nuclear Magnetic Resonance. Pages 151-163 in Nielsen SS, Food Analysis. Springer International Publishing.
- Rhodes CJ. 2017. Magnetic resonance spectroscopy. *Science progress* **100**:241–292.
- Riva A, Kolimár D, Spittler A, Wisgrill L, Herbold CW, Abrankó L, Berry D. 2020. Conversion of Rutin, a Prevalent Dietary Flavonol, by the Human Gut Microbiota. *Frontiers in Microbiology* **11**.
- Roessner U, Wagner C, Kopka J, Trethewey RN, Willmitzer L. 2000. Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography–mass spectrometry. *The Plant Journal* **23**:131–142.
- Roessner U, Willmitzer L, Fernie AR. 2002. Metabolic profiling and biochemical phenotyping of plant systems. *Plant Cell Reports* **21**:189–196.
- Rotimi DE, Elebiyo TC, Ojo OA. 2023. Therapeutic potential of rutin in male infertility: A mini review. *Journal of Integrative Medicine* **21**:130–135.
- Salazar N, Arboleya S, Valdés L, Stanton C, Ross P, Ruiz L, Gueimonde M, de Los Reyes-Gavilán CG. 2014. The human intestinal microbiome at extreme ages of life. Dietary intervention as a way to counteract alterations. *Frontiers in genetics* **5**:406.
- Santacruz A et al. 2010. Gut microbiota composition is associated with body weight, weight gain and biochemical parameters in pregnant women. *The British journal of nutrition* **104**:83–92.
- Santhakumar AB, Battino M, Alvarez-Suarez JM. 2018. Dietary polyphenols: Structures, bioavailability and protective effects against atherosclerosis. *Food and Chemical Toxicology* **113**:49–65.
- Santos BL et al. 2011. Antiproliferative, proapoptotic and morphogenic effects of the flavonoid rutin on human glioblastoma cells. *Food Chemistry* **127**:404–411.
- Segers K et al. 2020. CE-MS metabolic profiling of volume-restricted plasma samples from an acute mouse model for epileptic seizures to discover potentially involved metabolomic features. *Talanta* **217**:121107.
- Selloum L, Bouriche H, Tigrine C, Boudoukha C. 2003. Anti-inflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophils chemotaxis and degranulation. *Experimental and Toxicologic Pathology* **54**:313–318.

- Semwal R, Joshi SK, Semwal RB, Semwal DK. 2021. Health benefits and limitations of rutin- A natural flavonoid with high nutraceutical value. *Phytochemistry Letters* **46**:119–128.
- Sender R, Fuchs S, Milo R. 2016. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS biology* (e1002533). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533>
- Sensoy I. 2021. A review on the food digestion in the digestive tract and the used *in vitro* models. *Current Research in Food Science* **4**:308–319.
- Sheu JR, Hsiao G, Chou PH, Shen MY, Chou DS. 2004. Mechanisms involved in the antiplatelet activity of rutin, a glycoside of the flavonol quercetin, in human platelets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**:4414–4418.
- Shulaev V. 2006. Metabolomics technology and bioinformatics. *Briefings in Bioinformatics* **7**:128–139.
- Schaeffer WI. 1979. Proposed usage of animal tissue culture terms (Revised 1978) Usage of vertebrate cell, tissue and organ culture terminology. *In Vitro* **15**:649–653.
- Scher JU et al. 2015. Decreased bacterial diversity characterizes the altered gut microbiota in patients with psoriatic arthritis, resembling dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Arthritis & rheumatology* **67**:128–139.
- Schloissnig S et al. 2013. Genomic variation landscape of the human gut microbiome. *Nature* **493**:45–50.
- Schneider H, Schwiertz A, Collins MD, Blaut M. 1999. Anaerobic transformation of quercetin-3-glucoside by bacteria from the human intestinal tract. *Archives of Microbiology* **171**:81–91.
- Schönberger K, Mitterer M, Glaser K, Stecher M, Hobitz S, Schain-Zota D, Schuldes K, Lämmermann T, Rambold AS, Cabezas-Wallscheid N, Buescher JM. 2023. LC-MS-Based Targeted Metabolomics for FACS-Purified Rare Cells. *Analytical Chemistry* **95**:4325–4334.
- Schurr MJ et al. 2009. Phase I/II clinical evaluation of StrataGraft: a consistent, pathogen-free human skin substitute. *The Journal of trauma* **66**:866–874.
- Solovyev PA, Fahl-Hassek C, Riedl J, Esslinger S, Bontempo L, Camin F. 2021. NMR spectroscopy in wine authentication: An official control perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **20**:2040–2062.

- Souleimani A, Asselin C. 1993. Regulation of c-myc expression by sodium butyrate in the colon carcinoma cell line Caco-2. *FEBS Letters* **326**:45–50.
- Steinbrecht S, König R, Schmidtke KU, Herzog N, Scheibner K, Krüger-Genge A, Jung F, Kammerer S, Küpper JH. 2019. Metabolic activity testing can underestimate acute drug cytotoxicity as revealed by HepG2 cell clones overexpressing cytochrome P450 2C19 and 3A4. *Toxicology* **412**:37–47.
- Stromsnes K, Lagzdina R, Olaso-Gonzalez G, Gimeno-Mallench L, Gambini J. 2021. Pharmacological Properties of Polyphenols: Bioavailability, Mechanisms of Action, and Biological Effects in In Vitro Studies, Animal Models, and Humans. *Biomedicines* **9**:1074.
- Strugari AFG, Stan MS, Gharbia S, Hermenean A, Dinischiotu A. 2018. Characterization of Nanoparticle Intestinal Transport Using an In Vitro Co-Culture Model. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)* **9**:5.
- Suzuki T, Morishita T, Noda T, Ishiguro K. 2015. Acute and subacute toxicity studies on rutin-rich Tartary buckwheat dough in experimental animals. *Journal of nutritional science and vitaminology* **61**:175-181.
- Tan J, McKenzie C, Potamitis M, Thorburn AN, Mackay CR, Macia L. 2014. Chapter Three - The Role of Short-Chain Fatty Acids in Health and Disease. *Advances in Immunology*. Pages 91-119 in Academic Press.
- Taniguchi M, Arakawa A, Nishio M, Okamura T, Ohnishi C, Kadowaki K, Kohira K, Homma F, Matsumoto K, Ishii K. 2020. Differential Metabolomics Profiles Identified by CE-TOFMS between High and Low Intramuscular Fat Amount in Fattening Pigs. *Metabolites* **10**:322.
- Tazoe H, Otomo Y, Kaji I, Tanaka R, Karaki SI, Kuwahara AJJPP. 2008. Roles of short-chain fatty acids receptors, GPR41 and GPR43 on colonic functions. *J Physiol Pharmacol* **59**:251-262.
- Tobar-Delgado E, Mejía-España D, Osorio-Mora O, Serna-Cock L. 2023. Rutin: Family Farming Products' Extraction Sources, Industrial Applications and Current Trends in Biological Activity Protection. *Molecules* **28**:5864.
- Tolstikov V, Fiehn O. 2002. Analysis of Highly Polar Compounds of Plant Origin: Combination of Hydrophilic Interaction Chromatography and Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry. *Analytical Biochemistry* **301**:298–307.
- Valério DA et al. 2009. Quercetin Reduces Inflammatory Pain: Inhibition of Oxidative Stress and Cytokine Production. *Journal of Natural Products* **72**:1975–1979.

- Vendrame S, Guglielmetti S, Riso P, Arioli S, Klimis-Zacas D, Porrini M. 2011. Six-Week Consumption of a Wild Blueberry Powder Drink Increases Bifidobacteria in the Human Gut. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**:12815–12820.
- Vicente-Muñoz S, Morcillo I, Puchades-Carrasco L, Payá V, Pellicer A, Pineda-Lucena A. 2015. Nuclear magnetic resonance metabolomic profiling of urine provides a noninvasive alternative to the identification of biomarkers associated with endometriosis. *Fertility and Sterility* **104**:1202–1209.
- Vinelli V et al. 2022. Effects of Dietary Fibers on Short-Chain Fatty Acids and Gut Microbiota Composition in Healthy Adults: A Systematic Review. *Nutrients* **14**:2559.
- Watkins SM, German JB. 2002a. Toward the implementation of metabolomic assessments of human health and nutrition. *Current Opinion in Biotechnology* **13**:512–516.
- Watkins SM, German JB. 2002b. Metabolomics and biochemical profiling in drug discovery and development. *Current Opinion in Molecular Therapeutics* **4**:224–228.
- Welsch CA, Lachance PA, Wasserman BP. 1989. Dietary Phenolic Compounds: Inhibition of Na⁺-Dependent D-Glucose Uptake in Rat Intestinal Brush Border Membrane Vesicles. *The Journal of Nutrition* **119**:1698–1704.
- Wider G. 2000. Structure Determination of Biological Macromolecules in Solution Using Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *BioTechniques* **29**:1278–1294.
- Wilson RH, Mortarotti TG, Doxtader EK. 1947. Toxicity Studies on Rutin. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **64**:324–327.
- Wishart DS et al. 2018. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic acids research* **46**:608–617.
- Wishart DS. 2008. Metabolomics: applications to food science and nutrition research. *Trends in Food Science & Technology* **19**:482–493.
- Wishart DS. 2016. Emerging applications of metabolomics in drug discovery and precision medicine. *Nature Reviews Drug Discovery* **15**:473–484.
- Wu B, Kulkarni K, Basu S, Zhang S, Hu M. 2011a. First-Pass Metabolism via UDP-Glucuronosyltransferase: a Barrier to Oral Bioavailability of Phenolics. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **100**:3655–3681.
- Wu GD et al. 2011b. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science (New York, N.Y.)* **334**:105–108.

- Wu H, Su M, Jin H, Li X, Wang P, Chen J, Chen J. 2020. Rutin-Loaded Silver Nanoparticles With Antithrombotic Function. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **8**.
- Xiong HH, Lin SY, Chen LL, Ouyang KH, Wang WJ. 2023. The Interaction between Flavonoids and Intestinal Microbes: A Review. *Foods* **12**:320.
- Yamakoshi J, Tokutake S, Kikuchi M, Kubota Y, Konishi H, Mitsuoka T. 2001. Effect of Proanthocyanidin-Rich Extract from Grape Seeds on Human Fecal Flora and Fecal Odor. *Microbial Ecology in Health and Disease* **13**:25–31.
- Yan S, Huang J, Chen Z, Jiang Z, Li X, Chen Z. 2016. Metabolomics in gut microbiota: applications and challenges. *Science Bulletin* **61**:1151–1153.
- Yan X, Hu Y, Wang B, Wang S, Zhang X. 2020. Metabolic Dysregulation Contributes to the Progression of Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neuroscience* **14**.
- Yang Y, Zhang F. 2008. Ultrasound-assisted extraction of rutin and quercetin from *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb. *Ultrasonics Sonochemistry* **15**:308–313.
- Yap A, Nishiumi S, Yoshida K, Ashida H. 2007. Rat L6 myotubes as an in vitro model system to study GLUT4-dependent glucose uptake stimulated by inositol derivatives. *Cytotechnology* **55**:103–108.
- Yatsunenکو et al. 2012. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* **486**: 222–227.
- Zhang F, Yang Y, Su P, Guo Z. 2009. Microwave-assisted extraction of rutin and quercetin from the stalks of *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb. *Phytochemical Analysis* **20**:33–37.
- Zhang W, Guled F, Hankemeier T, Ramautar R. 2019. Utility of sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry for metabolic profiling of limited sample amounts. *Journal of Chromatography B* **1105**:10–14.
- Zhang W, Hankemeier T, Ramautar R. 2017. Next-generation capillary electrophoresis–mass spectrometry approaches in metabolomics. *Current Opinion in Biotechnology* **43**:1–7.
- Zhang X, Song J, Shi X, Miao S, Li Y, Wen A. 2013. Absorption and Metabolism Characteristics of Rutin in Caco-2 Cells. *The Scientific World Journal* (e382350). <https://doi.org/10.1155/2013/382350>
- Zhang Y, Li S, Wu X. 2008. Pressurized liquid extraction of flavonoids from *Houttuynia cordata* Thunb. *Separation and Purification Technology* **58**:305–310.

- Zhao C. 2023. Cell culture: in vitro model system and a promising path to in vivo applications. *Journal of Histotechnology* **46**:1–4.
- Zheng L, MacKenzie ED, Karim SA, Hedley A, Blyth K, Kalna G, Watson DG, Szlosarek P, Frezza CH, Gottlieb E. 2013. Reversed argininosuccinate lyase activity in fumarate hydratase-deficient cancer cells. *Cancer Metab* **1**:12.
- Zhou J, Chen J, Hu C, Xie Z, Li H, Wei S, Wang D, Wen C, Xu G. 2016. Exploration of the serum metabolite signature in patients with rheumatoid arthritis using gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **127**:60–67.
- Ziaee A, Zamansoltani F, Nassiri-Asl M, Abbasi E. 2009. Effects of Rutin on Lipid Profile in Hypercholesterolaemic Rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* **104**:253–258.

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

ABC	ATP-binding cassette = ABC transportní proteiny
CE-MS	Kapilární elektroforéza s hmotnostní spektrometrií
D ₂ O	Deuterovaná voda
DMEM	Dulbecco's modified Eagles medium
ESI-MS	Elektrosprejová ionizační hmotnostní spektrometrie
FBS	Fetální bovinní sérum
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrií
HPLC	High-performance liquid chromatography = vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UHPLC	Ultra-High-Performance Liquid Chromatography = ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LC-MS	Kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrií
LDL	Low density lipoprotein = nízkodenzitní lipoprotein
MRP	Multirezistentní proteiny
NEAA	Neesenciální aminokyseliny
NMR	Nukleární magnetická rezonance
P-gp	P-glykoprotein
SCFA	Mastné kyseliny s krátkým řetězcem
SGLT	Sodium-glukose transport protein = glukosový transportér
TOF	Time of flight t = doba letu
WST	Water soluble tetrazolium = vodou rozpustná tetrazoliová sůl
3,4-DHT	3,4-dihydroxytoluen
3,4-diOHPAA	Kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová
3-OHPAA	Kyselina 3-hydroxyfenyloctová
3-OHPPA	Kyselina 3-(3-hydroxyfenyl) propionová
4-OHPAA	Kyselina 4-hydroxyfenyloctová

