

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Metabolismus vybraných 2-arylbenzofuranů v tlustém
střevě**

Diplomová práce

Autor práce: Eva Pávová

Obor studia: Kvalita a zpracování zemědělských produktů

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

**Konzultant: Ing. Veronika Jarošová, Mgr. Petr Maršík, Ph.D.,
Ing. Ondřej Veselý**

© 2018 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci „Metabolismus vybraných 2-arylbenzofuranů v tlustém střevě“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 13.4.2018

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Havlíkovi, Ing. Jarošové a Ing. Veselému za odbornou pomoc při vedení této práce. Dále poděkování patří Mgr. Maršíkovi, Ph.D., který se skvěle stará o přístroje v laboratoři. Jeho rady při vyhodnocování výsledků byly také přínosné. V neposlední řadě patří velké poděkování mému příteli za pomoc se psaním práce před i po operaci zápěstí. Bez jeho pomoci by sepsání práce bylo velmi obtížné.

Projekt byl podpořen z prostředků grantové agentury GA ČR, projekt 16-07193S.

Metabolismus vybraných 2-arylbenzofuranů v tlustém střevě

Souhrn

2-Arylbenzofurany jsou vzácné polyfenolové látky, které se vyskytují pouze v několika rostlinných čeledích. Hojně jsou zastoupeny ve všech částech moruše (rod *Morus*). Vykazují řadu účinků na lidské zdraví, které začínají být v současnosti zkoumány a mají potenciál pro využití v medicíně a výživě člověka. Cílem této diplomové práce bylo přispět k objasnění metabolismu 2-arylbenzofuranů v tlustém střevě na základě hypotézy, že 2-arylbenzofurany jsou ve střevě rozkládány střevní mikrobiotou a dále metabolizovány do vstřebatelných bioaktivních forem obdobným způsobem jako jiné dieteticky významné polyfenoly. V prvním kroku byla provedena fermentace vybraných 2-arylbenzofuranů (mulberrofuran G, mulberrofuran Y a moracin C) v *in vitro* modelu lidskou stolicí.

Produkty *in vitro* fermentace byly následně analyzovány pomocí analýz LC/MS a GC/MS. Pomocí obou analýz byly identifikovány mateřské molekuly. V rámci cílové analýzy byly pomocí LC/MS a GC/MS hledány potenciální metabolity, které by mohly vznikat v důsledku fermentace zkoumaných látek. Potenciální metabolity byly vytipovány na základě poznatků z literatury. V dalším kroku při hledání potenciálních metabolitů byla provedena rozdílová analýza pomocí software XCMS online. Výsledky byly prozkoumány pomocí knihovny METLIN a na základě výsledků z XCMS bylo navrženo několik potenciálních metabolitů. V rámci této práce však nemohlo být již potvrzeno, zda nalezené potenciální metabolity z testovaných látek opravdu vznikají.

Klíčová slova: 2-arylbenzofurany, polyfenoly, moruše, mikrobiální metabolismus, fermentace

Colonic metabolism of selected 2-arylbenzofurans

Summary

2-Arylbenzofurans are rare polyphenolic compounds, which have been found in only a limited number of plant families. They can be found in all parts of the mulberry tree (*Morus*). They exhibit bioactive effects with a potential for use in medicine and human nutrition. The aim of this diploma thesis was to explore the metabolism of selected 2-arylbenzofurans based on the hypothesis that these compounds are degraded in the colon by the intestinal microbiome in a similar fashion as other structurally or biochemically related polyphenolic compounds. To achieve this, an *in vitro* fermentation was carried out using human faeces from donors.

The products of the *in vitro* fermentation were subsequently analyzed using LC/MS and GC/MS analysis. The parent compounds were identified in both these analyses. A targeted analysis was carried out in which potential metabolites of the parent compounds were searched for. A list of potential metabolites had been created based on research from literature. Following LC/MS analysis, a non-targeted analysis using a metabolomics platform called XCMS online was carried out. An online database METLIN was used to help with the analysis of the results from XCMS analysis. A few compounds had been suggested in the XCMS analysis as possible metabolites of the parent compounds; however within the scope of this diploma thesis, no definite conclusion could be made whether these potential metabolites really come from the metabolism of the selected compounds.

Keywords: 2-arylbenzofurans, polyphenols, mulberry, microbial metabolism, fermentation

Obsah

1 Úvod.....	1
2 Cíl práce a hypotéza.....	2
2.1 Cíl práce	2
2.2 Hypotéza.....	2
3 Literární rešerše	3
3.1 Význam fenolových sloučenin v potravinách	3
3.1.1 Flavonoidy	3
3.1.2 Ne flavonoidní polyfenoly	4
3.1.2.1 Fenolové kyseliny.....	4
3.1.2.2 Taniny (trísloviny).....	4
3.1.2.3 Stilbenoidy.....	5
3.1.2.4 2-Arylbenzofurany	6
3.1.3 Syntéza 2-arylbenzofuranů v rostlinách	6
3.2 Moruše.....	7
3.2.1 <i>Morus alba</i>	7
3.2.1.1 Popis a využití	7
3.2.2 Fytochemie rodu <i>Morus</i>	8
3.2.2.1 Plody.....	8
3.2.2.2 Listy	8
3.2.2.3 Semena	9
3.2.3 Antimikrobiální aktivita rodu <i>Morus</i> a 2-arylbenzofuranů.....	9
3.2.3.1 Testy na extraktech.....	9
3.2.3.2 Látky vykazující antimikrobiální aktivitu izolované z moruše	10
3.2.3.3 2-Arylbenzofurany vyskytující se v rostlinách rodu <i>Morus</i>	10
3.2.3.4 Další příbuzné látky.....	11
3.3 Metabolismus fenolových a polyfenolových sloučenin.....	11
3.3.1 Zdroje fenolových látek v potravě	11
3.3.2 Chemická forma a vlastnosti ovlivňující metabolismus	11
3.3.3 Trávicí trakt a trávení polyfenolů	12
3.3.3.1 Ústa.....	13
3.3.3.2 Žaludek	13
3.3.3.3 Střevní trakt	13

3.3.3.4	Biotransformace polyfenolů	14
3.3.4	Vliv střevní mikrobioty na metabolismus fenolových látek.....	16
3.3.5	Způsoby rozkladu fenolových látek.....	16
3.3.6	Využitelnost a míra biologické aktivity polyfenolů	17
3.4	Bakterie lidského trávicího traktu.....	18
3.4.1	Vývoj mikrobioty u dětí.....	18
3.4.2	Zastoupení mikrobioty v jednotlivých částech trávicího traktu.....	18
3.4.3	Faktory ovlivňující složení mikrobioty.....	20
3.4.3.1	Vliv polyfenolů na složení mikrobioty.....	20
3.4.3.2	Mechanismy inhibice bakterií vlivem působení polyfenolů	21
4	Materiál a metody	22
4.1	Charakteristika experimentu a popis dárců.....	22
4.2	Popis dárců a odběr vzorků	23
4.3	Chemikálie	23
4.3.1	Chemikálie pro fermentaci.....	23
4.3.2	Chemikálie pro extrakce	24
4.3.3	Standardy	24
4.4	Fermentace.....	24
4.4.1	Suroviny pro fermentaci	24
4.4.2	Postup fermentace	25
4.5	LC/MS analýza	26
4.5.1	Příprava vzorků.....	26
4.5.2	Podmínky analýzy.....	27
4.6	GC/MS analýza.....	27
4.6.1	Příprava standardů a vzorků	27
4.6.2	Podmínky analýzy.....	28
4.6.3	Vyhodnocování výsledků	28
5	Výsledky a diskuze	29
5.1	Cílová analýza LC/MS.....	29
5.1.1	Identifikace testovaných látek	29
5.1.2	Vývoj intenzity testovaných látek v čase.....	30
5.1.3	Hledání potenciálních metabolitů	33
5.2	GC/MS analýza.....	35
5.2.1	Identifikace testovaných látek	35

5.3	Analýza metabolických produktů rozpadu pomocí software XCMS.....	38
6	Závěr.....	42
7	Přílohy	50

1 Úvod

Tato práce se zabývá popisem, účinky a metabolismem vybraných 2-arylbenofuranů. Jedná se o ne příliš rozšířené a málo prozkoumané látky. V současné době začínají být tyto látky studovány, protože vykazují řadu účinků na lidský organismus. Přestože se jedná o látky poměrně vzácné a málo prozkoumané, nachází se hojně v některých jedlých rostlinných druzích. V našich podmínkách se jedná především o moruše.

V současné době je pěstování morušovníku v České republice okrajovou záležitostí, stejně tak jako konzumace výrobků z moruše. Ve většině obchodních sítí v České republice nelze výrobky z moruše zakoupit. Výjimkou jsou specializované prodejny se zdravou nebo specializovanou výživou.

V historii však byla moruše poměrně významnou plodinou i na našem území, a to především kvůli výrobě hedvábí. V souvislosti s vyšším rozšířením této plodiny pro výrobu hedvábí souvisela i zvýšená konzumace morušových plodů. Do Evropy se hedvábnictví rozšířilo z Číny a v Česku byla snaha o jeho rozšíření v 18. století. Tato snaha o produkci vlastního hedvábí přetrvala až do poloviny 50. let 20. století. Na našem území existoval Výzkumný ústav bavlnářský a hedvábnický. Vzhledem k proměně textilního průmyslu se výrazně změnilo výzkumné zaměření tohoto ústavu a výzkum hedvábí není v současné době provozován. Dalším ústavem, který může poskytnout informace ohledně pěstování moruše nebo chovu bource morušového, je Výzkumný ústav včelařský. V současné době není v této činnosti aktivní.

Cílem výzkumu je přispět ke zvýšení povědomí o zdravotních účincích této plodiny. Toto by mohlo v budoucnu zajistit rozvoj nového trhu, který by mohl přispět k znovurozšíření morušovníku na území České republiky a rozšíření sortimentu výrobků z moruše v obchodní síti.

2 Cíl práce a hypotéza

2.1 Cíl práce

2-arylbzofurany jsou vzácné polyfenolové látky, které se vyskytují pouze v několika rostlinných čeledích. Hojně jsou zastoupeny ve všech částech moruše (rod *Morus*). Vykazují řadu účinků na lidské zdraví, které jsou v současnosti zkoumány a mají potenciál v lékařství a výživě člověka. Vzhledem k tomu, že metabolismus tlustého střeva často hraje zásadní roli v bioaktivaci polyfenolových látek a jejich transformaci do účinných forem, byla provedena fermentace vybraných 2-arylbzofuranů v *in vitro* modelu lidskou stolicí.

Cílem práce bylo zjistit, zda jsou 2-arylbzofurany rozkládány střevní mikrobiotou. Zároveň byl sledován vznik potenciálních metabolitů rozkladu.

2.2 Hypotéza

2-Arylbzofurany jsou ve střevě dále metabolizovány do vstřebatelných bioaktivních forem.

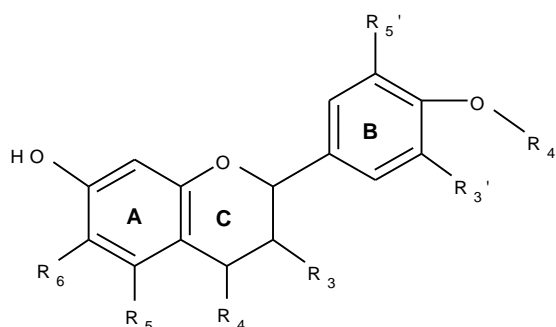
3 Literární rešerše

3.1 Význam fenolových sloučenin v potravinách

Fenolové látky jsou v potravinách hojně zastoupeny, nalezneme je téměř ve všech potravinách. Přirozeně mají nízký obsah fenolových sloučenin většinou potraviny živočišného původu, tedy např. maso nebo mléko aj. Zdrojem fenolových látek v lidské stravě jsou rostlinné produkty (Bravo, 1998). Fenol a jeho sloučeniny mají baktericidní účinek a vykazují jistou míru toxicity vůči organismům ohrožující rostliny (Giada, 2013). V rostlinách fenolové sloučeniny působí jako ochrana proti škůdcům – hmyzu a jiným živočichům. (Crozier, Jaganath and Clifford, 2007). Zvýšená koncentrace těchto látek bývá pozorována v poraněných rostlinných tkáních (Botta *et al.*, 2005). Komerčně jsou fenolové sloučeniny pro své účinky používány v různých oborech jako například desinfekční prostředky (např. chlorhexidin), přísady do pesticidů (např. dinitrofenol) nebo léčiva (např. kyselina salicylová je výchozí látkou při výrobě acylpyrinu.).

3.1.1 Flavonoidy

Flavonoidy tvoří nejpočetnější skupinu fenolových sloučenin nacházejících se v potravinách. Obsahují patnáct uhlíků, které jsou uspořádány tak, že dvě aromatická jádra jsou spojena tříuhlíkovým můstkem. Ve vysokých koncentracích se nachází v pokožce listů a v slupce plodů (Crozier, Jaganath and Clifford, 2007). Flavonoidy mohou být dále rozděleny do 13 tříd. Dělení je založeno na způsobu připojení aromatického jádra „B“ k uhlíkatému skeletu „C“. Dále se jednotlivé podtřídy liší mírou oxidace a funkčními skupinami na uhlíkovém skeletu „C“ (Beecher, 2003). Důležité podtřídy z hlediska významu pro výživu jsou flavony, flavonoly, flavan-3-oly, isoflavony, flavanony a antokyany. Ostatní flavonoidové podtřídy se v potravinách vyskytují v minimálním množství (Crozier, Jaganath and Clifford, 2007). Flavonoidy se v rostlinách nacházejí zpravidla ve formě glykosidů. Mezi flavonoidy jsou v rostlinách nejčastěji přítomny flavony (např. apigenin, luteolin, diosmetin) a flavonoly (např. kvercetin, myricetin, kaempferol) (Bravo, 1998).



Obrázek 1: Obecná struktura flavonoidu.

3.1.2 Ne flavonoidní polyfenoly

3.1.2.1 Fenolové kyseliny

Hlavními ne flavonoidními látkami z hlediska významu pro výživu jsou fenolové kyseliny. Blíže rozlišujeme deriváty benzoové kyseliny (např. vanillová, gallová, salicylová) a deriváty skořicové kyseliny (*p*-kumarová, kávová, ferulová) (Crozier, Jaganath and Clifford, 2007). Mezi další významné kyseliny v potravinách patří ester kyseliny kávové a chinové. Dále je přítomna kyselina chlorogenová, která se vyskytuje ve velkém množství v listech maté (cesmíny paraguayské) a v zelených kávových bobech odrůdy Robusta. Vysoký příjem této kyseliny mají tedy obecně v našich podmínkách konzumenti kávy (Crozier, Jaganath and Clifford, 2007).

Kyselina gallová je nejdůležitější z fenolových kyselin, je prekurzorem následujících fenolových sloučenin: skořicových kyselin, stilbenů a hydrolyzovatelných taninů (Bravo, 1998).

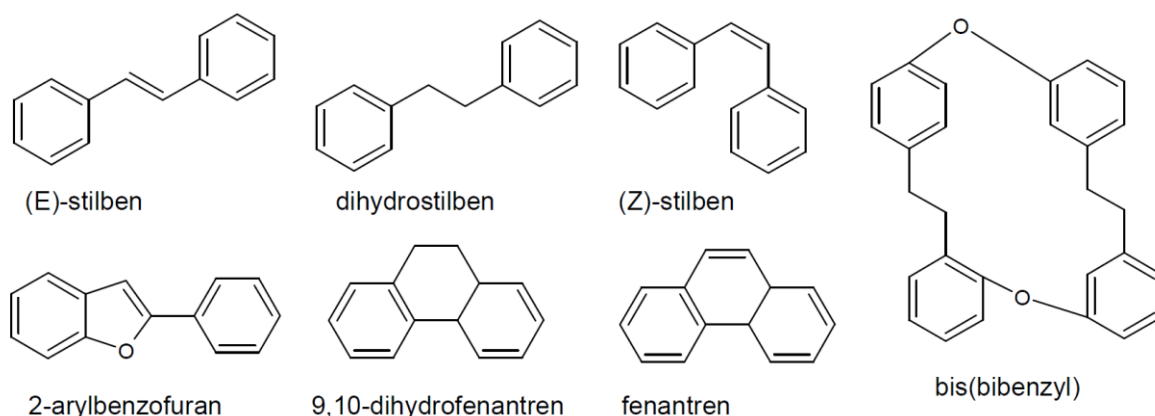
3.1.2.2 Taniny (třísloviny)

Taniny vznikají z flavonoidů polymerizací do delších řetězců. Mohou vznikat přímo v rostlinách, nebo při jejich zpracování. Existuje několik podtříd taninů. Z těchto jsou pro lidskou potřebu nejdůležitější tři. Jedná se o kondenzované taniny, hydrolyzovatelné taniny a deriváty taninů (Beecher, 2003). Kondenzované taniny vznikají z monomerních jednotek flavanolů a jsou spojené vazbou C—C a éterovými vazbami. Hydrolyzovatelné taniny vznikají z kyseliny gallové případně ellagové a nearomatického polyolu (cukr, kyselina chinová atd.). Při zpracování rostlin vznikají deriváty taninů, složité sloučeniny, které se jinak v intaktních rostlinných pletivech téměř nevyskytují (Beecher, 2003). Taniny jsou ve

vysokých koncentracích obsaženy v mnoha nezralých plodech, většinou ve vnějších vrstvách. Jejich obsah se při zrání ovoce snižuje. Kromě potravinářství se používají v kožedělném průmyslu pro činění kůží (Crozier, Jaganath and Clifford, 2007).

3.1.2.3 Stilbenoidy

Stilbenoidy jsou strukturou podobné flavonoidům. Podle Rivière et al. (2012) se k stilbenoidům také řadí bibenzyly, dihydrostilbeny, bis(benzyly), fenanthreny, 9,10-dihydrofenanthreny a dále také v této práci sledované 2-arylbenzofurany (Rivière, Pawlus and Mérillon, 2012). Ty jsou deriváty stilbenoidů. Tyto výše jmenované látky jsou příbuzné z biochemického hlediska. V rostlinách jsou tvořeny ve fenylypropanoidové dráze. Chemická struktura jednotlivých sloučenin je znázorněna na obrázku 2. Stilbenoidy a příbuzné sloučeniny se nevyskytují ve všech rostlinných čeledích, ale vyskytují se v různých fylogeneticky vzdálených čeledích. Jejich vysoký obsah byl nalezen v liánovcovitých (*Gnetaceae*), borovicovitých (*Pinaceae*), šachorovitých (*Cyperaceae*), bobovitých (*Fabaceae*), révovitých (*Vitaceae*) a dvojkřídlačovitých (*Dipterocarpaceae*) (Rivière, Pawlus and Mérillon, 2012). Mnoho stilbenoidů má antibakteriální účinky a dále také farmakologické účinky (Ozcan *et al.*, 2014). Mezi nejvýznamnější farmakologické účinky, které jsou v současné době studovány, jsou antimikrobiální, antihelmintické, protizánětlivé, cytotoxické, antidiabetické, antiaterosklerotické a další (Venkatesh and Seema, 2008). Většina farmakologicky aktivních látek byla nalezena v extraktech z listů. Vyskytují se i v kořenech a kůře, méně v plodech (Chan, Lye and Wong, 2016). Nejvýznamnějším stilbenoidem je resveratrol, který se vyskytuje především v hroznech, víně, sóje a arašidech. Velmi vysoký obsah byl nalezen v křídlatce japonské, která je v Asii používána pro přípravu bylinných čajů (Crozier, Jaganath and Clifford, 2007). Hlavním zdrojem stilbenoidů v potravě je čeleď révovitých. Z této čeledě se na konzumaci se nejvíce podílí hrozny a červené víno (Rivière, Pawlus and Mérillon, 2012).



Obrázek 2: Skelety různých stilbenových struktur, upr. podle (Rivière, Pawlus and Mérillon, 2012).

3.1.2.4 2-Arylbenzofurany

Tyto stilbenoidům příbuzné látky jsou poměrně vzácné. Byly nalezeny pouze v sedmi čeledích: *Corsiniaceae*, liánovcovité (*Gnetaceae*), kýchavicovité (*Melanthiaceae*), stemonovité (*Stemonaceae*), morušovníkovité (*Moraceae*), bobovité (*Fabaceae*) a révovité (*Vitaceae*) (Rivière, Pawlus and Mérillon, 2012). Benzofuran, který je základem těchto sloučenin, sám vykazuje řadu biologických účinků. Sloučeniny obsahující benzofuran nachází rozmanité využití v medicíně. Významná je antimikrobiální aktivita těchto sloučenin. Některé z nich vykazují účinnost srovnatelnou s běžně používanými antibiotiky (Nevagi, Dighe and Dighe, 2015). Velmi významnou čeledí vyznačující se vysokým výskytem 2-arylbenzofuranů je čeleď *Moraceae* (Kostic *et al.*, 2015). Z hlediska lidské výživy je významný především rod *Morus*.

3.1.3 Syntéza 2-arylbenzofuranů v rostlinách

Biochemicky mohou být 2-arylbenzofurany tvořeny z isoflavonoidů (výskyt především v bobovitých) nebo ze stilbenoidů (častější varianta) (Rivière, Pawlus and Mérillon, 2012). V přílohách je uvedeno stručné schéma s příklady na obrázku 12. Z isoflavonoidů vznikají 2',4',6-trioxygenované 2-arylbenzofurany, například vignafuran. Vznik ze stilbenoidů je vysoce pravděpodobný vzhledem k výskytu strukturně podobného resveratrolu a oxyresveratrolu v rostlinách, kde se nacházejí 3',5',6-trioxygenované 2-arylbenzofurany (Von Reuß and König, 2004). Resveratrol se nejčastěji vyskytuje ve formě *trans*- a vzniká kondenzací 4-kumaroyl-CoA a třech molekul malonyl-CoA. Reakce je katalyzována

enzymem STS (stilben syntáza) (Jeandet *et al.*, 2012). Výchozími sloučeninami pro vznik resveratrolu jsou aminokyseliny fenylalanin nebo tyrosin. Při syntéze z fenylalaninu jsou meziprodukty 4-kumaroylu-CoA skořicová kyselina a *p*-skořicová kyselina. Při tvorbě z tyrosinu je meziproduktem pouze skořicová kyselina (Iriti and Faoro, 2009). Schéma na obrázku číslo 11 v přílohách znázorňuje tyto reakce. Příkladem 2-arylbenzofuranu, který vzniká přes stilben je moracin M (Von Reuß and König, 2004). Dále byl popsán vznik 2-arylbenzofuranu Diels-Alderovou reakcí (viz obrázek číslo 13 v přílohách). Tato reakce má význam při syntéze řady složitých molekul, které obsahují šestiuhlíkaté cyklické struktury. Tato reakce je definována jako [4+2] cykloadice. Při této reakci spolu reagují tři dvojně vazby (jeden konjugovaný dien a jeden substituovaný alken). Stocking a Williams (2003) uvádí, že touto reakcí mohou vznikat mulberrofurany a dále také příbuzné sloučeniny chalcomoracin, kuwanon V a kuwanon J. Bylo zjištěno, že základem je kondenzace dvou molekul, u kterých je uváděn vznik z cinnamoylpolyketidu. Předpokládá se, že začátek syntézy u těchto látek probíhá stejnou drahou jako syntéza stilbenoidů (Stocking and Williams, 2003).

3.2 Moruše

Odhaduje se, že rod *Morus* pochází z himálajské oblasti Indie. Centrem původu mohla být také Čína, Japonsko, Korea (Vijayan, Srivastava and Awasthi, 2004). V současné době se pěstují druhy rodu *Morus* v teplých a vlhkých podnebí, v geografických lokalitách ležících zhruba mezi 50. severní a 10. jižní rovnoběžkou. Identifikace druhu v rámci rodu *Morus* je sporná. Linné (1753) rozdělil rod *Morus* do sedmi druhů: *Morus alba*, *Morus nigra*, *Morus rubra*, *Morus tartarica*, *Morus indica*, *Morus papyrifera* a *Morus tinctora* (Vijayan, Srivastava and Awasthi, 2004). Z výše uvedených je pro lidskou výživu nejvíce pěstován a využíván *Morus alba*, *Morus nigra* a *Morus rubra* (Singh *et al.*, 2013). Nejvíce studovaným druhem je v současnosti *Morus alba*.

3.2.1 *Morus alba*

3.2.1.1 Popis a využití

Jedná se o středně velký listnatý strom. Plod (synkarp) je bílý, červený nebo černý (Singh *et al.*, 2013). Listy jsou ve východní a jihovýchodní Asii používány k výrobě bylinného čaje. V Turecku a okolních zemích se pěstuje především pro plody. Ty jsou využívány pro výrobu

džusů, likérů a džemů, nebo se konzervují (Chan, Lye and Wong, 2016). Moruše je také významnou průmyslovou plodinou. Její listy (především *Morus alba*) jsou jedinou potravou pro bource morušového, který je využíván pro výrobu hedvábí. V Číně je na produkci 1 kg kokonů spotřebováno 15–18 kg listů. V zemědělství může být moruše dále využívána pro krmení dobytka, u kterého zvyšuje produkci mléka (Chan, Lye and Wong, 2016). Dále je možné využití zeleného pigmentu listů pro barvení v potravinářském průmyslu (Ramos, David and Waing, 2016). Využití nachází *Morus alba* i v medicíně. Rod *Morus* vykazuje antioxidační, antimikrobiální a protizánětlivé účinky. Již dlouhodobě je využíván v čínské medicíně například pro léčbu horečky, vysokého tlaku, chudokrevnosti, jako zlepšující přípravek pro funkci jater atd. (Dimitrova *et al.*, 2015). V současné medicíně je věnována pozornost antidiabetickému účinku. Ten je přisuzován přítomnosti alkaloidů, především 1-deoxynojirimycinu (DNJ) (Genovese, 2016). Významná je také antioxidační aktivita této rostliny, která je také způsobena obsahem biologicky aktivních polyfenolů (Dimitrova *et al.*, 2015).

3.2.2 Fytochemie rodu *Morus*

3.2.2.1 Plody

Plody obsahují přibližně 81–82 % vody, asi 14 % sacharidů, 1,5 % bílkovin, 1,5 % hrubé vlákniny, 0,5 % lipidů a 0,6 % popelovin. Plody jsou dále bohaté na minerální látky. Velmi významný je výskyt fenolových látek. Jsou přítomny jejich různé skupiny. Celkový obsah fenolových látek v plodech se pohybuje od 7,7 do 11,2 mg/g sušiny (GAE). Významně vysoký je i obsah alkaloidů v čerstvých plodech (660 mg/100 g) (Łochyńska, 2015). Dimitrova *et al.* (2015) uvádí, že obsah fenolových látek v *Morus alba* je nižší, než v *Morus nigra* a *Morus rubra* s tím, že nejvyšší biologickou aktivitu vykazuje *Morus rubra*. Obsah fenolových látek může být poněkud variabilní. Závisí na několika faktorech – na volbě extrakční metody, zralosti plodů, genetických rozdílech, pěstitelských podmínkách atd. (de Oliveira *et al.*, 2015).

3.2.2.2 Listy

Listy jsou stejně jako plody bohaté na bioaktivní látky a obsah základních živin v sušině listů je 15–31 % bílkovin, 2–8 % lipidů, 28–44 % vlákniny a 11–17 % popelovin. Obsah vody se pohybuje v rozmezí od 68 do 74 % (Dimitrova *et al.*, 2015). Celkový obsah fenolových látek

je od 12,8 do 15,5 mg/g sušiny (GAE). Obsah alkaloidů se pohybuje v rozmezí od 0,3 do 3,9 mg/g (Łochyńska, 2015).

3.2.2.3 Semena

Semena obsahují 25–35 % oleje, který je bohatý na ceněné omega-3 mastné kyseliny. Nejvíce jsou v semenech zastoupeny tyto kyseliny: linolová (76,8 %) a olejová (7,1 %) (Łochyńska, 2015). Dalšími významnými složkami jsou sacharidy (42–46 %) a bílkoviny (20–23 %). Obsah fenolových látek je oproti ostatním částem rostliny relativně nízký (1,1–1,5 mg/g čerstvých semen) (Gecgel, Velioglu and Velioglu, 2011).

3.2.3 Antimikrobiální aktivita rodu *Morus* a 2-arylbenzofuranů

Rostliny mají velký potenciál při inhibici patogenních bakterií. Význam výzkumu ohledně antimikrobiální aktivity rostlinných materiálů je především v tom, že mechanismus této inhibice je odlišný od antibiotik, a proto používání antimikrobiálních látek z rostlin může přispět k minimalizaci antibiotické rezistence (Genovese, 2016).

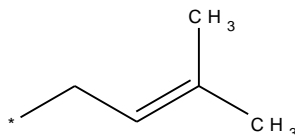
3.2.3.1 Testy na extraktech

Genovese (2016) srovnával antimikrobiální aktivitu acetonového, etanolového, metanolového a etylacetátového extraktu z listů proti vybraným grampozitivním a gramnegativním bakteriím. Acetonový extrakt byl nejvíce účinný ze všech proti grampozitivním bakteriím a zároveň jediný účinný proti gramnegativním bakteriím. Singh et al. (Singh *et al.*, 2013) uvádí, že chloroformový extrakt vykazuje silnou antimikrobiální aktivitu vůči *Bacillus subtilis*. Dále uvádí, že frakce extrahované kyselinou octovou působí také proti *B. subtilis*, dále proti *Staphylococcus aureus* a *E. coli*. Dle Ramose a Wainga (2016) je ethanol nejúčinnější rozpouštědlo pro extrakce polyfenolů z moruše. Kromě toho Piotrovská et al. uvádí, že antimikrobiální aktivita je silnější u *Morus rubra* a *Morus nigra*, než u *Morus alba* (2012). Mimo to Minhas et al. (2016) provedli studie citlivosti běžně se v potravinách vyskytujících patogenních bakterií na extrakty z *Morus nigra*. Byly měřeny inhibiční zóny pomocí diskového difuzního testu. Vysoká citlivost u extraktů z plodů byla zjištěna pro *E. coli* (ethanolový a acetonový extrakt), *Klebsiella pneumoniae* (ethanolový a methanolový extrakt), *Serratia marcescens* (acetonový a chloroformový extrakt), *Pseudomonas aeruginosa* (chloroformový extrakt), *Staphylococcus aureus* (ethanolový, acetonový a chloroformový extrakt), *Streptococcus pyogenes* (ethanolový extrakt) a *Neisseria spp* (ethanolový,

methanolový a acetonový extrakt). Anwar et al. (2015) uvádí účinnost ethanolového extraktu z listu proti *Listeria monocytogenes*. De Oliveira et al. (2015) testovali minimální inhibiční koncentraci ethanolového extraktu z listů *Morus alba* proti vybraným mikroorganismům. Vysoká inhibice byla zjištěna u *Candida albicans* LM-106. Poměrně silná aktivita byla zjištěna i u jiných druhů rodu *Candida*. Účinné proti infekčním patogenům jsou extrakty z polárních rozpouštědel, naopak extrakty z nepolárních rozpouštědel účinnost neprokazují (Minhas et al., 2016).

3.2.3.2 Látky vykazující antimikrobiální aktivitu izolované z moruše

V současné době je předmětem zájmu skupina prenylovaných flavonoidů, u kterých se předpokládá vysoká antimikrobiální aktivita (Botta et al., 2005). Tyto látky jsou charakterizovány přítomností prenylové skupiny.



Obrázek 3: Prenylová skupina.

Mechanismus jejich biologického účinku spočívá v jejich silné afinitě k biologickým membránám. Kromě morušovníkovitých (*Moraceae*) se vyskytují ve větším množství v bobovitých (*Fabaceae*) (Botta et al., 2005). Významným zdrojem je také pivo (Stevens and Page, 2004). Mezi tyto látky se řadí významné biologicky aktivní látky v moruši včetně 2-arylbenzofuranů.

3.2.3.3 2-Arylbenzofurany vyskytující se v rostlinách rodu *Morus*

Ze známých látek s prokázanou antimikrobiální aktivitou lze uvést mulberrofuran G, albanol B, chalcomoracin a moracin C. Dle Sohn et al. (2004) vykazuje silnou antimikrobiální aktivitu mulberrofuran G a albanol B. Chalcomoracin, jenž se vyskytuje v listech (Chan, Lye and Wong, 2016), vykazuje významnou antimikrobiální aktivitu proti *Staphylococcus aureus* včetně rezistentních kmenů. Účinnost této látky byla vyšší než u albanolu B (Fukai, Kaitou and Terada, 2005). Navíc antimikrobiální aktivita proti *Staphylococcus aureus* je pozorována u moracinu C, kde byla však prokázána nižší aktivita (Kim, Sohn and Kim, 2012). Chan et al. (2016) uvádí, že moracin C se vyskytuje v listech, stoncích a kořenech. Společně

s antimikrobiální aktivitou je uváděna jako další výhoda 2-arylbenzofuranů pro použití v medicíně a podobných oborech jejich nízká toxicita (Chan, Lye and Wong, 2016).

3.2.3.4 Další příbuzné látky

Mezi další významné látky patří kuwanon C, u kterého je popsána silná antimikrobiální aktivita (Sohn *et al.*, 2004). Vyskytuje se v listech a kořenech moruše (Chan, Lye and Wong, 2016). Proti grampozitivním bakteriím vykazuje specifickou aktivitu sanggenon B a D a dále morusin (Sohn *et al.*, 2004). Morusin se vyskytuje v listech a kořenech moruše (Chan, Lye and Wong, 2016). Sanggenon B a D (výskyt v kůře moruše) vykazují silnou aktivitu proti *S. aureus*, *Enterococcus faecalis* a některým plísním (Singh *et al.*, 2013). Strukturální vzorce výše uvedených látek jsou uvedeny na obrázku číslo 14 v přílohách.

3.3 Metabolismus fenolových a polyfenolových sloučenin

3.3.1 Zdroje fenolových látek v potravě

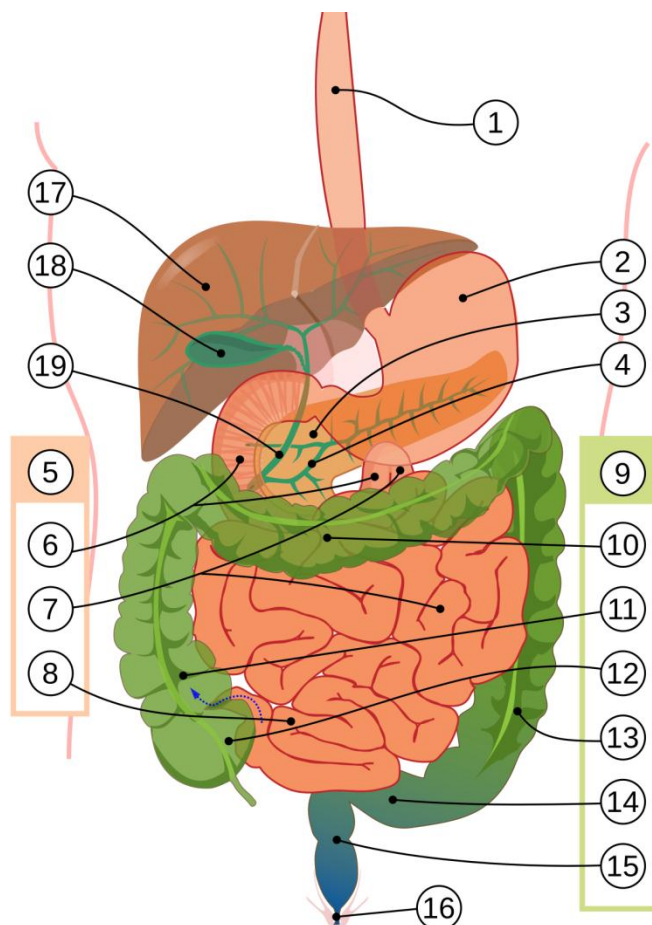
Příjem rostlinných fenolů závisí především na druhu a množství konzumované rostlinné stravy. Denní příjem rostlinných fenolů je odhadován na 150–1000 mg (Aura, 2008). Z fenolových sloučenin jsou v největší míře přijímány flavonoidy. Výjimku mohou tvořit konzumenti kávy, kteří mohou přijímat více fenolových kyselin, než flavonoidů. Toto je způsobeno vysokým množstvím kyseliny chlorogenové v kávě (50–150 mg v šálku kávy) (Slanina and Táborská, 2004).

3.3.2 Chemická forma a vlastnosti ovlivňující metabolismus

Chemická forma zásadně ovlivňuje metabolismus a biodostupnost fenolových sloučenin. Důležitým kritériem je rozpustnost. Ve vodě rozpustné sloučeniny mohou přímo proniknout střevní stěnou do krevního řečiště. Zde se nalézají v nezměněné podobě, nebo jako metabolity (Giada, 2013). Nerozpustné fenolové sloučeniny nejsou stráveny a jsou částečně, nebo úplně vyloučeny stolicí nebo mohou být metabolizovány střevní mikrobiotou (Bravo, 1998). Další z faktorů, které ovlivňují využitelnost a vstřebávání polyfenolů, je celkové složení potravy, ve které jsou přijímány. Polyfenoly mohou reagovat s různými složkami potravy. Například určité proteiny a sacharidy mohou mít velký vliv na způsob vstřebávání a trávení těchto polyfenolů (Tarko, Duda-Chodak and Tuszynski, 2009).

3.3.3 Trávicí trakt a trávení polyfenolů

Trávicí trakt je místem vstřebávání a katabolismu živin a i xenobiotik, včetně polyfenolů. V závislosti na struktuře jsou vstřebávány v různých částech trávicího traktu.



Obrázek 4: Schéma části trávicího traktu člověka. Zdroj: volné dílo (Mariana Ruiz), upraveno.

1 – jícen, 2 – žaludek, 3 – slinivka břišní (pankreas), 4 – vývody pankreatu;
5 – tenké střevo: 6 – dvanáctník (duodenum), 7 – lačník (jejunum), 8 – kyčelník (ileum);
9 – tlusté střevo: 10 – příčný tračník, 11 – vzestupný tračník, 12 – slepé střevo, 13 – sestupný tračník, 14 – esovitá klička, 15 – konečník;
16 – řitní otvor, 17 – játra, 18 – žlučník, 19 – žlučovod.

3.3.3.1 Ústa

Přestože hlavním místem trávení polyfenolů je tenké a tlusté střevo, je dokázáno, že k částečnému trávení a vstřebávání dochází již v dutině ústní. Rozložené, případně nerozložené látky mohou být dále vstřebávány přes střevní epitel. Toto platí například pro katechiny ze zeleného čaje (Slanina and Táborská, 2004). Fenolové sloučeniny se často nachází ve formě glykosidů, dále také esterů nebo polymerů. Základním rozkladným procesem je štěpení glykosidů na aglykony. Štěpení, které nastává již v ústech, je způsobeno mikroorganismy nebo enzymem beta-glykosidázou (Duda-Chodak *et al.*, 2015). Účinnost štěpení je závislá na druhu cukru v molekule (Aura, 2005). Polyfenoly a jejich metabolity jsou v nízkých koncentracích přítomny ve slinách (Aura, 2008).

3.3.3.2 Žaludek

K dalšímu štěpení dochází v žaludku vlivem nízkého pH (Aura, 2005). Účinky u jednotlivých sloučenin se však liší. Pandey a Rizvi (2009) uvádí, že většina glykosidů hydrolyze v žaludku odolává. Účinnost štěpení se dále liší v závislosti na aktuální hodnotě pH, která kolísá mezi hodnotami 1 až 5, přičemž nejvyšší hodnoty nastávají po požití potravy (Petra, Rus and Dumitrașcu, 2017). Absorpce sloučenin z této části trávicího traktu není běžná. Předpokládá se, že u většiny polyfenolových sloučenin až na výjimky nenastává. Dle studie na krysách bylo zjištěno, že ke vstřebávání ze žaludku může docházet u některých flavonoidů, jako je kvercetin (Passamonti *et al.*, 2003) a dále u antokyanů (Keppler and Humpf, 2005).

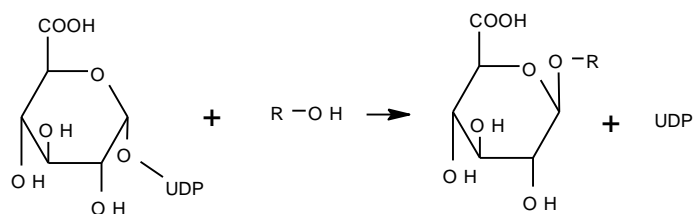
3.3.3.3 Střevní trakt

Jak již bylo řečeno, hlavním místem trávení a metabolismu je střevní trakt. Odhaduje se, že asi 48 % polyfenolů je stráveno v tenkém střevě (především nativními enzymy) a 42 % v tlustém střevě (především mikrobiálními enzymy). Zbývajících 10 % zůstává nestráveno a nevyužito (Duda-Chodak *et al.*, 2015). Existují i zdroje, které uvádějí hodnoty pro trávení v tenkém střevě mnohem nižší (5–10 %) (Cardona *et al.*, 2013). Střevní stěnou mohou být většinou vstřebávány pouze aglykony a obecně malé molekuly (Cardona *et al.*, 2013). Vstřebávání probíhá formou prosté difuze. Existují však některé polyfenoly, které mohou být tímto způsobem vstřebány i bez odštěpení sacharidu (deglykosylace). Z nativních enzymů má pro deglykosidaci největší význam laktáza (Aura, 2005). Tento enzym působí přímo v lumen tenkého střeva. Jedná se o poměrně nespecifickou beta-glukosidázu (Frič, 2010). Mezi další enzymy schopné štěpit polyfenoly patří například cytosolová beta-glukosidáza, která se

vyskytuje především v játrech, ale je přítomna i v dalších tkáních (Guinane and Cotter, 2013). Vstřebávání je poměrně složitý proces. Kromě resorpce látek je dalším úkolem střevního epitelu tvorba fyzické bariéry, která reguluje mezibuněčný přenos látek z vnějšího prostředí, čímž zabraňuje vstupu většiny antigenů. Tato bariéra je zesílena mukózní vrstvou obsahující glykoproteiny – muciny (Aura, 2008). Mezi další ochranné prvky organismu proti antigenům patří syntéza antimikrobiálních peptidů a dalších sekretů (žluč, kyseliny, enzymy) (Aura, 2008). V neposlední řadě patří do ochranných mechanismů i přítomnost střevní mikrobioty.

3.3.3.4 Biotransformace polyfenolů

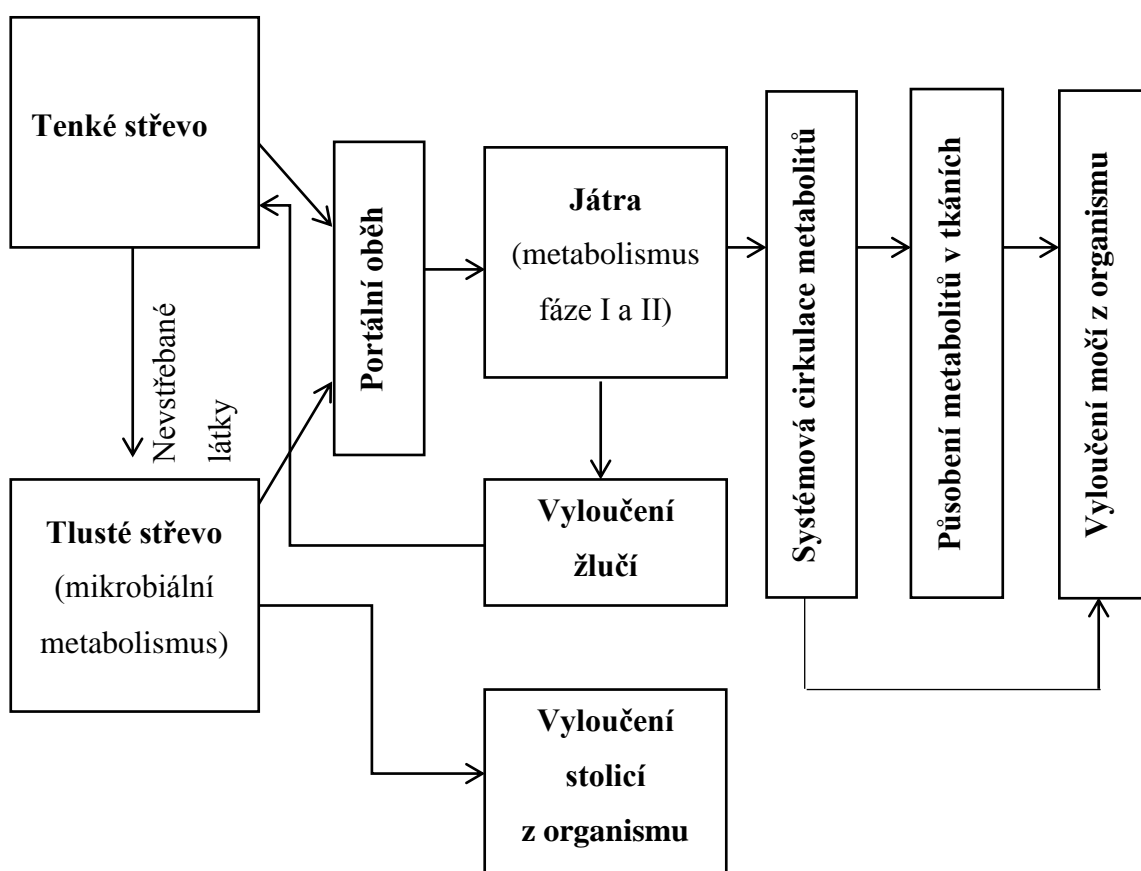
Po resorpci ze střeva mohou být polyfenoly a jejich mikrobiální metabolity absorbovány do krve a dále jsou metabolizovány enzymy přítomnými v tkáních člověka. Většina těchto látek je metabolizována v játrech. Polyfenoly jsou metabolizovány stejným způsobem jako xenobiotika (Scalbert *et al.*, 2002). Metabolismus probíhá ve dvou fázích. Enzymy fáze I



Obrázek 5: Glukuronidace.

provádějí především oxidační, redukční a hydrolytické reakce. Cílem je přeměna méně polárních látek na více polární. Ve fázi II vzniká spojením metabolitu z fáze I. a konjugačního činidla konjugát. Existují různé typy konjugace: glukuronidace, sulfatace, methylace, acetylace atd. (Verhoeckx *et al.*, 2015). Proces konjugace je z výše popsaných procesů nejvýznamnější a dochází k němu nejčastěji v játrech. Proces však může probíhat i v kyčelníku (Aura, 2008). Nejvýznamnější reakcí je konjugace s kyselinou glukoronovou (glukuronidace – viz obrázek číslo 5). V tomto procesu jsou aglykony vstřebávány přes epiteliální buňky, odkud jsou přenášeny do místa, kde dochází k vlastní konjugaci. Prakticky všechny polyfenolové sloučeniny jsou až na výjimky konjugovány. Volné aglykony jsou v plasmě nacházeny výjimečně například u phloretinu, který se v organismu vyskytuje v konjugované i nekonjugované formě (Scalbert *et al.*, 2002). Dále se mohou nekonjugované polyfenoly vyskytnout při příjmu jejich vysokých dávek, kdy dojde k nasycení konjugačních enzymů (Scalbert *et al.*, 2002). Po konjugaci jsou konjugáty vráceny žlučí zpět do tenkého střeva, případně částečně mohou být vyloučeny močí (Ozcan *et al.*, 2014). Míra vylučování

močí se liší u jednotlivých látek. Vysoké hodnoty byly zaznamenány u kávové kyseliny (27 % z celkového příjmu). Hodnoty 3–27 % byly zaznamenány u katechinu, isoflavonu ze sóji, flavanonu z citrusů a anthokyanů z červeného vína. Nízké hodnoty byly zaznamenány u rutinu a theaflavinů z čaje (Scalbert *et al.*, 2002). Konjugáty, které byly vyloučeny žlučí zpět do tenkého střeva, jsou dále znovu transportovány do tlustého střeva, kde mohou být opět dekonjugovány mikroorganismy (Rechner *et al.*, 2004). Dekonjugace je katalyzována mikrobiálními enzymy (alfa-rhamnosidázou, beta-glukodidázou, beta-glukuronidázou) (Aura, 2005). Následně mohou vznikat mikrobiální metabolity, které mohou být znovu vstřebány do organismu a využity.



Obrázek 6: Schématické znázornění metabolismu fenolových látek, upraveno podle (Cardona *et al.*, 2013).

3.3.4 Vliv střevní mikrobioty na metabolismus fenolových látek

Vliv střevní mikrobioty na metabolismus a vstřebávání je způsoben její schopností ovlivňovat propustnost střevní membrány. Navíc má střevní mikrobiota schopnost ovlivňovat expresi některých genů a sekreci antimikrobiálních peptidů (Aura, 2005). Dále střevní mikrobiota přináší do lidského organismu další enzymy. Jedná se o vlastní enzymy, kterými jsou tráveny ještě nestrávené polyfenoly, přičemž tyto enzymy regulují expresi genů, které se podílí na metabolismu sacharidů, lipidů a léčiv (Laparra and Sanz, 2010). Zásadním vlivem mikroorganismů na metabolismus fenolových látek je však schopnost degradace těchto jinak těžce vstřebatelných látek (Olthof *et al.*, 2003). Polyfenoly jsou bakteriemi rozkládány pomocí enzymů, jako jsou beta-glukosidáza, beta-rhamnosidáza a esterázy. Na rozdíl od nativních enzymů jsou mikrobiální enzymy schopny rozkládat polyfenolové řetězce na jednoduché jednotky.

3.3.5 Způsoby rozkladu fenolových látek

V literatuře jsou již popsány způsoby rozkladu významných skupin fenolových látek. Ačkoliv jednotlivé fenolové látky se velmi liší strukturou, při mikrobiální degradaci vznikají podobné produkty z různých struktur (Rechner *et al.*, 2004; Parkar, Trower and Stevenson, 2013). Typický rozklad začíná deglykosilací a pokračuje štěpením složitých struktur, kde výsledkem jsou jednoduché aromatické karboxylové kyseliny (běžně nazývané fenolové kyseliny) (Parkar, Trower and Stevenson, 2013). Průběh a způsob rozkladu jsou závislé především na složení střevní mikrobioty a jejím enzymovém vybavení. Enzymy jsou schopny hydrolyzovat řadu různých sloučenin, jako glykosidy, glukuronidy, sulfáty, amidy, estery a laktony (Duda-Chodak *et al.*, 2015). Významnými chemickými reakcemi, ke kterým při rozkladu dochází, jsou především redukce dvojných vazeb, odštěpení karboxylových skupin (dekarboxylace), odštěpení CH₃ skupiny (demetylace) a různé izomerační reakce. Další významnou reakcí typickou pro štěpení polyfenolů je štěpení uhlíkové vazby u flavonoidních polyfenolů. Štěpení může být heterocyklický uhlíkatý skelet nebo také flavonoidový „A kruh“ (Stevens and Maier, 2016). U flavonoidních látek s flavanovým skeletem dochází ke štěpení zpravidla otevřením kruhu na druhém nebo třetím uhlíku (Stevens and Maier, 2016). Bylo zjištěno, že štěpení může probíhat u stejné látky několika způsoby, což má i vliv na tvorbu výsledných produktů. Například štěpením kvercetinu vzniká 3,4-dihydroxyfenylfenylactová kyselina nebo 3-(3-hydroxyfenyl)-propionová kyselina (Parkar, Trower and Stevenson, 2013).

Rozdíly ve složení střevní mikrobioty u různých jedinců se projevují v rozdílném poměru vznikajících metabolitů u jednotlivých jedinců (Rechner *et al.*, 2004; Gómez-Juaristi *et al.*, 2018). Například u chlorogenové kyseliny byl za použití fermentační *in vitro* metody zaznamenán vznik těchto metabolitů: kávová kyselina, 3-(3,4-dihydroxyfenyl)-propionová kyselina a 3-(3-hydroxyfenyl)-propionová kyselina. Hlavním metabolitem byla 3-(3,4-dihydroxyfenyl)-propionová kyselina nebo 3-(3-hydroxyfenyl)-propionová kyselina v závislosti na metabolismu jednotlivých dárců (Rechner *et al.*, 2004). Kromě složení mikrobioty má vliv na způsob rozkladu také koncentrace vstupní látky. Například při zkoumání rozkladu chlorogenové kyseliny bylo zjištěno, že zvýšením koncentrace při dávkování v *in vitro* modelu dochází k poklesu rozkladu a je pozorován menší nárůst metabolitů (Scalbert *et al.*, 2002).

3.3.6 Využitelnost a míra biologické aktivity polyfenolů

Vysoký příjem polyfenolů v potravě nutně neznamená, že budou všechny tyto látky v organismu zpracovány. Řada polyfenolů je sice v přírodních produktech hojně zastoupena, nejsou však pro člověka využitelné. Vliv na využitelnost polyfenolů má především chemická struktura přijímané potravy a dále také stupeň zpracování potravy a přítomnost jiných živin. Polyfenoly ze zpracovaných potravin mají často nižší využitelnost. Jako příklad lze uvést nižší využitelnost polyfenolů z mandlových jader po jejich blanšírování (Ozcan *et al.*, 2014). Z reakcí s jinými živinami jsou významné reakce mezi fenolovými sloučeninami a proteiny. Tyto reakce většinou způsobují popisovanou nižší využitelnost (Iriti and Faoro, 2009). Nižší využitelnost je rovněž způsobena reakcemi s vlákninou (Ozcan *et al.*, 2014). Naopak větší využitelnost bývá spojována s reakcemi s lipidy (Aura, 2008). Vliv na biologickou aktivitu polyfenolů mají také metabolické změny v organismu jako je konjugace. Konjugace obecně snižuje biologickou účinnost těchto látek. Jako příklad lze uvést snížení antioxidační kapacity konjugovaných polyfenolů oproti aglykonům (Scalbert *et al.*, 2002). U některých polyfenolů může konjugace sloužit jako ochrana organismu. Například byla zjištěna *in vitro* karcinogenita kvercetinu, nicméně tento efekt nebyl pozorován *in vivo* (Scalbert *et al.*, 2002). Vliv na využitelnost polyfenolů není dán pouze jejich strukturou, ale také úrovní metabolismu jedince. Využitelnost je také silně ovlivněna rozdíly ve složení střevní mikroflóry mezi jedinci, jak bylo popsáno v části 3.3.5. Ta však může být z části ovlivněna přijímanými polyfenoly tak, že může dojít k posunu rovnováhy mezi jednotlivými mikrobiálními populacemi. Cardona *et al.* (2013) uvádí, že polyfenolové sloučeniny se mohou uplatnit jako antimikrobiální látky, které potlačují řadu patogenních bakterií v trávicím traktu.

V neposlední řadě bylo zjištěno, že při určitých onemocněních (například při zánětlivých reakcích) může docházet v organismu k dekonjugaci polyfenolů, čímž se mění jejich biologická aktivita (Scalbert *et al.*, 2002).

3.4 Bakterie lidského trávicího traktu

Trávicí trakt obsahuje velké množství bakteriálních druhů – uvádí se, že jich je více než 800 (Aura, 2008). Údaje se však mezi zdroji liší. Bakteriální mikrobiota má pro člověka obrovský význam z hlediska výživy a zdraví. Metabolická aktivita střevní mikrobioty přispívá k trávení potravy, využití a přeměně energie, zásobování mikronutrienty a přeměně toxických látek (Frič, 2010). Nerovnováha ve střevní mikrobiotě je spojována s řadou chorob, především metabolickými a imunitními chorobami (Laparra and Sanz, 2010), a proto je v současné době studium lidských bakteriálních populací předmětem zájmu především v lékařských oborech a ve výživě člověka.

3.4.1 Vývoj mikrobioty u dětí

Hlavní vývoj mikrobioty jedince začíná po narození. Dříve se předpokládalo, že novorozenec je sterilní. Dnes se již objevují i studie, které tvrdí, že osidlování jedince mikrobiotou začíná již v průběhu těhotenství matky (Mueller *et al.*, 2015). Při osidlování novorozence mikrobiotou má velký vliv na její konečné složení několik faktorů: především způsob porodu a také skutečnost, zda matka kojí nebo ne (Biasucci *et al.*, 2010). První osidlující mikroorganismy pochází při přirozeném porodu z vagíny matky. Jedná se především o fakultativně anaerobní druhy, jako jsou *E. coli*, *Staphylococcus* a *Streptococcus*. Následně se rozvíjejí anaerobní rody jako např. *Bacteroides* a *Bifidobacterium*. U dětí do 2 let je hlavním rodem *Bifidobacterium*. Dle (Laparra and Sanz, 2010) zastoupení tohoto rodu může činit až 90 %. Nižší zastoupení *Bifidobacterium* je pozorováno u dětí krmených náhradní výživou oproti dětem přirozeně kojeným (Mueller *et al.*, 2015). Od věku 2–3 let dítěte se mikrobiota podobá svým zastoupením mikrobiotě dospělého jedince (Frič, 2010).

3.4.2 Zastoupení mikrobioty v jednotlivých částech trávicího traktu

Z prostředí vstupují mikroorganismy do trávicího traktu přes dutinu ústní. Uvádí se, že jsou zde zastoupeny všechny druhy mikroorganismů (anaeroby, aeroby, kvasinky). Významné jsou především *Streptococcus viridans*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*,

Haemophilus influenzae, *Candida albicans* a gramnegativní mikroby (Švestka, 2007). Další důležitou částí trávicího traktu je žaludek. Prostředí žaludku je pro přežití mikrobioty velmi nehostinné. Zde je poměrně nízká koncentrace mikroorganismů oproti jiným částem trávicího traktu. Dosahuje asi 10^3 KTJ/g (Lata and Juránková, 2011). Dlouhou dobu přetrvávala představa o sterilitě žaludku. Nyní je již známo, že i v tomto prostředí mohou přežívat některé mikroorganismy. Z významných mikroorganismů adaptovaných na prostředí žaludku je *Helicobacter pylori*. Jedná se o gramnegativní anaerobní bakterii, která má spíše negativní význam pro hostitele, protože je uváděna do souvislosti se vznikem žaludečních vředů (Frič, 2010). Petra, Rus and Dumitrașcu (2017) uvádí, že *Helicobacter pylori* je přítomna alespoň u 50 % světové populace. Zároveň pokud je tato bakterie přítomna, převažuje nad ostatními mikrobiálními společenstvy. Kromě *Helicobacter pylori* však byla zjištěna přítomnost i jiných mikroorganismů, mezi které patří různé druhy aerobních mikroorganismů, především *Streptococcus*, *Lactobacillus* a *Propionibacterium* (Petra, Rus and Dumitrașcu, 2017). Výskyt anaerobních mikroorganismů v žaludku je vzácný (Lata and Juránková, 2011).

Mikrobiota začátku tenkého střeva má složení podobné jako žaludek. Koncentrace mikroorganismů zde postupně narůstá od duodena po ileum. V jejunu dosahuje koncentrace asi 10^5 KTJ/g a v ileu koncentrace kolísá mezi 10^3 – 10^9 KTJ/g (Lata and Juránková, 2011). Jsou zde přítomny aerobní mikroorganismy a postupně se začínají objevovat i anaerobní organismy. Významnými aerobními druhy jsou čeled' *Enterobacteriaceae*, streptokoky, stafylokoky, laktobacily a kvasinky. Z anaerobních jsou přítomny bakteroidy, bifidobakterie, peptostreptokoky a v ileu se začínají objevovat klostridia (Švestka, 2007). Následující a z hlediska osídlení mikrobiotou nejvýznamnější částí trávicího traktu je tlusté střevo. Zde hodnoty dosahují 10^{10} – 10^{12} KTJ/g (Lata and Juránková, 2011). V tlustém střevě dochází vlivem vhodných podmínek k největšímu rozvoji anaerobních bakterií, především klostridií a eubakterií (Lata and Juránková, 2011). Jsou zde však zastoupeny všechny významné rody mikroorganismů, které se vyskytují rovněž v tenkém střevě. Hustota osídlení jednotlivých skupin mikroorganismů zde dosahuje nejvyšších koncentrací (Rajilić-Stojanović *et al.*, 2013).

V určitých případech se některé mikroorganismy mohou vyskytovat i ve vývodech slinivky, kde se z důvodu vysoké koncentrace žlučových kyselin a celkově nevhodného prostředí běžně mikrobiota nevyskytuje. Mohou zde však dlouhodobě přežívat některé lidské patogeny například rodu *Salmonella* (Frič, 2010).

3.4.3 Faktory ovlivňující složení mikrobioty

Podle dřívějších výzkumů převládal názor, že složení mikrobiálního společenstva je u všech jedinců přibližně stejné. Později se ukázalo, že mezi jedinci existují velké rozdíly v druhovém zastoupení a jeho rozmanitosti (Laparra and Sanz, 2010). Rozdíly jsou nejvíce patrné především v tlustém střevě, které je ze všech částí trávicího ústrojí osídleno mikroorganismy nejhustěji (Lata and Juránková, 2011). Zároveň je pozorována poměrně vysoká stabilita mikrobiálního společenství v rámci jednoho jedince. Tento jev naznačuje existenci neměnného jádra mikrobioty, která tvoří základní rovnovážný stav společenství, kdy při posunu této rovnováhy vlivem vnějších činitelů je vždy tendence k jejímu návratu (Guinane and Cotter, 2013).

Složení střevní mikrobioty je přesto ovlivněno různými faktory, z nichž jedním z nejdůležitějších je strava. Je dokázáno, že existují významné rozdíly ve složení lidské mikrobioty u jedinců konzumujících velké množství živočišných produktů a u jedinců konzumujících převážně stravu rostlinného původu (Laparra and Sanz, 2010). Dále je mikrobiální společenstvo jedince ovlivňováno zdravotním stavem. Narušení mikrobiální rovnováhy může přispívat k rozvoji určitých chorob a naopak (Frič, 2010). Velký vliv na mikrobiotu mají i některá léčiva, především antibiotika. Při užívání antibiotik významně klesá hustota i variabilita mikrobioty (Thursby and Juge, 2017). Dalším faktorem ovlivňujícím složení mikrobioty je věk. Byly zaznamenány rozdíly ve složení mikrobioty u populace starší 65 let (Thursby and Juge, 2017). U této populace dominuje v zastoupení kmen *Bacteroidetes*. Z dalších faktorů ovlivňujících mikrobiotu jedince je uváděna například geografická poloha ve velkém i malém měřítku (poloha státu; městský/venkovský styl života), kouření nebo psychický stav (Scalbert *et al.*, 2002).

3.4.3.1 Vliv polyfenolů na složení mikrobioty

Bylo zjištěno, že dávky určitých polyfenolových sloučenin mohou způsobit změnu ve složení střevní mikrobioty tím, že určité bakteriální populace jsou inhibovány a jiné mohou být zvýhodňovány. V *in vitro* studii bylo zjištěno, že katechin výrazně inhibuje růst *Clostridium histolyticum* a podporuje růst *E. Coli* (Tzounis *et al.*, 2008). V jiné *in vitro* studii používající fermentační model byl zjištěn vliv flavan-3-olů na zvýšení růstu laktobacilů a enterokoků (Cueva *et al.*, 2013). Také u taninů byl zjištěn inhibiční efekt na patogenní bakterie rodu *Clostridium* a *Bacteroides* spp. Anaerobní rody *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* byly ovlivněny méně (Lee *et al.*, 2006). Kromě *in vitro* studie zaměřené na vliv flavan-3-olů na

mikrobiální aktivitu existuje několik studií *in vivo* s flavan-3-olovými extrakty. Tyto studie obecně uvádějí probiotický efekt na *Lactobacillus* spp. a inhibiční efekt na *Clostridium* spp. (Cardona *et al.*, 2013). Proanthokyanidiny mají podobný efekt jako flavan-3-oly. Byl zjištěn pokles rodů *Bacteroides*, *Clostridium* a *Propionibacterium* při současném nárůstu rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* spp. při podávání flavan-3-olového extraktu při *in vivo* pokusu na krysách (Dolara *et al.*, 2005). Podobný prebiotický účinek na *Lactobacillus* spp. a *Bifidobacterium* spp. byl zjištěn u resveratrolu (Larrosa *et al.*, 2009).

3.4.3.2 Mechanismy inhibice bakterií vlivem působení polyfenolů

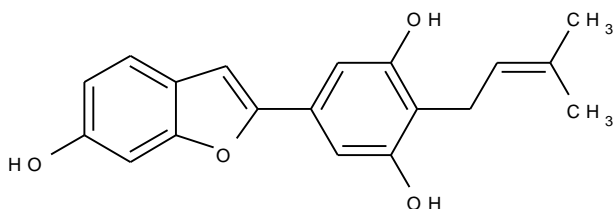
Působení na bakteriální růst a metabolismus je ovlivněno strukturou polyfenolu, koncentrací látky a druhem mikroorganismu. Gramnegativní bakterie jsou obecně méně citlivé než grampozitivní bakterie (Cardona *et al.*, 2013). V různých studiích byly zaznamenány různé mechanismy inhibice: (Hattori *et al.*, 1990) uvádí, že některé polyfenoly, například katechiny, produkují peroxid vodíku a tím mění propustnost mikrobiální membrány. (Stapleton *et al.*, 2007) uvádí, že (–)epikatechin-galát zeleného čaje zvyšuje citlivost rezistentního *S. aureus* vůči beta-laktamovým antibiotikům. Mechanismus účinku zahrnuje působení na buněčnou stěnu tohoto mikroorganismu. Dále bylo zjištěno, že polyfenoly mohou ovlivňovat quorum sensing u bakteriálních populací. U některých kmenů byl zjištěn vliv na inhibici bakteriálních signálních molekul, které zahajují exponenciální růst bakteriální populace (Huber *et al.*, 2003). Jiná studie uvádí, že flavonoidní „B kruh“ může inhibovat syntézu DNA a RNA u mikroorganismů (Cushnie and Lamb, 2005).

Většina studií se zaměřuje na pozitivní účinky polyfenolů při regulaci nežádoucí mikrobioty, avšak byl zaznamenán i vliv, který podporuje růst patogenní mikrobioty. (Cardona *et al.*, 2013) uvádí jako příklad katecholy, jejich zvýšený příjem může napomoci růstu patogenních bakterií v trávicím traktu, kde tyto bakterie jsou zvýhodňovány přijímáním železa z komplexů železo-polyfenol v případech, kdy tyto komplexy nemohou být využity jinými bakteriemi. Mimo vyjmenované mechanismy existuje ještě řada dalších mechanismů, které jsou v současné době zkoumány, avšak nejsou ještě objasněny.

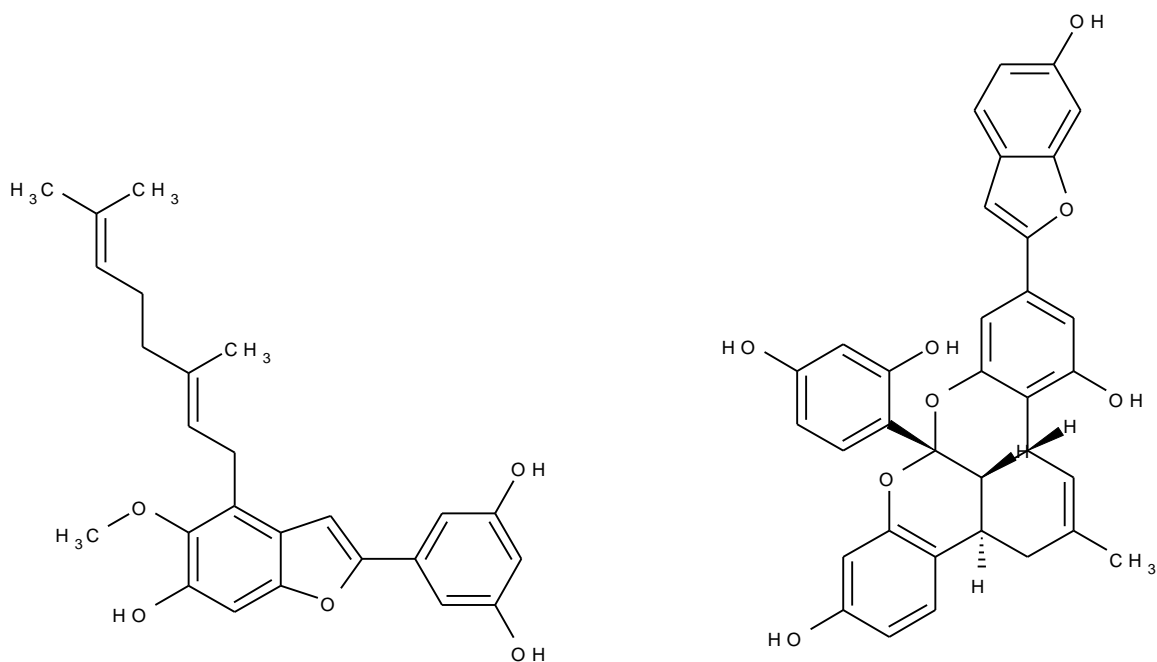
4 Materiál a metody

4.1 Charakteristika experimentu a popis dárců

Experiment, na kterém je založena tato práce, byl součástí projektu GA ČR 16-07193S „Protizánětlivá aktivita vybraných stilbenů, 2-arylbenzofuranů a jejich metabolitů“. Tento projekt se zabývá studiem rozkladu vybraných polyfenolových látek bakteriemi lidského trávicího traktu. Cílem tohoto projektu je zjistit, jakým způsobem se dané látky rozkládají. To může vést k jejich využití v potravinářském nebo farmaceutickém průmyslu. V rámci této diplomové práce byly sledovány následující látky: moracin C, mulberofuran G, mulberofuran Y. Jejich struktury jsou znázorněny na následujícím obrázku.



moracin C



mulberofuran Y

mulberofuran G

Obrázek 7: Struktury testovaných látek.

Pro stanovení přítomnosti sledovaných látek a jejich metabolitů byla použita LC/MS analýza (cílená a necílená). Zároveň byla také provedena GC/MS analýza po derivatizaci sililačním činidlem pro porovnání a potvrzení správnosti metody a zacílení na malé molekuly typu fenolových kyselin.

4.2 Popis dárců a odběr vzorků

Střevní bakterie byly získány ze stolice od třech zdravých dárců bez historie onemocnění trávicího traktu. Další podmínkou dárcovství bylo neužití antibiotik v průběhu 3 měsíců před odběrem. Věk dárců se pohyboval v rozmezí 23–29 let. Průměr BMI dárců byl 24,6. Dárci drželi před odběrem nízkofenolovou dietu po dobu 48 h. Jako nízkofenolová dieta byla považována dieta vylučující konzumaci většiny rostlinných produktů nebo výrobků obsahující rostlinné produkty včetně barviv a nápojů jako jsou čaj a káva. Byla povolena konzumace necelozrnného pečiva, rýže a těstovin.

Vzorky byly odebírány do plastových nádob a umístěny do plastových sáčků, kde pro úpravu atmosféry byl použit GENbag anaer (Biomerieux, Francie). Před zpracováním byly vzorky uchovávány při teplotě 37 °C po dobu max. 2 h.

4.3 Chemikálie

4.3.1 Chemikálie pro fermentaci

NH_4HCO_3 , NaHCO_3 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, trypton, resazurin, cystein hydrochlorid, NaOH , $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$, plynný dusík (OFN). Všechny složky byly od firmy Lach-Ner (CZ) nebo Sigma-Aldrich (CZ).

Moracin C, mulberrofurany G a Y byly získány z FaF VFU Brno.

4.3.2 Chemikálie pro extrakce

4.3.2.1 Pro LC/MS: Ethylacetát, Milli-q[®] voda, značený resveratrol C13, metanol s 1 % kyselinou mravenčí (v/v), plynný dusík (vše Lach-Ner nebo Sigma-Aldrich).

4.3.2.2 Pro GC/MS: Ethylacetát, Milli-q[®] voda, 2,4,5-trimethoxyskořicová kyselina, HCl, MeOH, N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroatedamide (BSTFA) + 1 % trimethylsiloxane (TMCS), hexan 99% bezvodý, plynný dusík (vše Lach-Ner nebo Sigma-Aldrich).

4.3.3 Standardy

4.3.3.1 Fenethylalkohol (Acros Organics, USA), kyselina močová (Sigma-Aldrich), 5-fenylvalerová kyselina (Sigma-Aldrich), fenylloctová kyselina (Sigma-Aldrich), p-hydroxyfenylloctová kyselina (MP Biomedicals, UK), 4-hydroxyfenylloctová kyselina (Sigma-Aldrich), kyselina vanilová (Sigma-Aldrich), 3,4-dihydroxybenzoová kyselina (Sigma-Aldrich), DL-3-fenylmléčná kyselina (Sigma-Aldrich), kyselina homovanilová (Sigma-Aldrich), 3,4-dihydroxyfenylloctová kyselina (Sigma-Aldrich), 3,4-dihydroxyhydroskořicová kyselina (Sigma-Aldrich), kyselina hippurová (Sigma-Aldrich), kyselina kávová (Sigma-Aldrich), 3-hydroxyfenylloctová kyselina (Sigma-Aldrich), 3-(3-hydroxyfenyl)propionová kyselina (Sigma-Aldrich), 3-hydroxy-4-methoxyfenylloctová kyselina (Sigma-Aldrich), 5-(4-hydroxyfenyl)pentanová kyselina (Alfa Aesar), 4-hydroxybenzoová kyselina (Sigma-Aldrich). Všechny standardy vykazovaly čistotu 98 % a více.

4.4 Fermentace

4.4.1 Suroviny pro fermentaci

Pro fermentaci byl použit roztok, který se skládal z fosfátového pufru, fermentačního média a redukčního roztoku, viz Tabulka 1. Zásobní roztoky byly připraveny smícháním jednotlivých složek.

Tabulka 1: Potřeba jednotlivých složek pro přípravu zásobních roztoků, dle protokolu.

Název složky	Složení a poměr složek
CO ₃ pufr	1 g NH ₄ HCO ₃ , 8,75 g NaHCO ₃ , voda do objemu 250 ml.
Makromineralní roztok	7,14 g Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O, 6,2 g KH ₂ PO ₄ , 0,6 g MgSO ₄ · 7 H ₂ O, voda do objemu 1000 ml.
Mikromineralní roztok	2,64 g CaCl ₂ · 2 H ₂ O, 2 g MnCl ₂ · 4 H ₂ O, 0,2 g CoCl ₂ · 6 H ₂ O, 1,6 g FeCl ₃ · 6 H ₂ O, voda do objemu 20 ml.
Fermentační médium	1,125 g tryptonu v 225 ml destilované vody, 56,25 µl mikromineralního roztoku, 112,5 ml CO ₃ pufru, 112,5 ml makromineralního roztoku, 562,5 µl 0,5% roztoku resazurinu.
Fosfátový pufr (pH = 7,0 při 20 °C)	195 ml 1/15M KH ₂ PO ₄ , 305 ml 1/15M Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O.
Redukční roztok	125 mg cystein hydrochlorid, 0,8 ml 1M NaOH, 125 mg Na ₂ S · 9 H ₂ O, voda do objemu 20 ml.

4.4.2 Postup fermentace

Stolice od dárce (24 g) byla homogenizována ve stomacheru (Laboratory Blender, Stomacher[®] 400 Circulator, EU) po dobu 30 s společně s fosfátovým pufr (75 ml). Výsledná homogenizovaná směs měla koncentraci 32 %. Před dalším použitím byla přefiltrována.

Každá z testovaných látek (moracin C, mulberrofurany G a Y) byla rozředěna v dimethylsulfoxidu na koncentraci 10 mg/ml tak, aby při výsledné použité koncentraci v testu, 10 µg/ml, byla koncentrace DMSO 0,1 %.

V dalším kroku bylo povařeno 120 ml fosfátového pufru a 500 ml fermentačního média (7 minut). Povařený roztok byl zchlazen na teplotu asi 37 °C. pH bylo upraveno pomocí 6M HCl na hodnotu pH 7,0. V dalším kroku bylo odpipetováno 16,8 ml připraveného roztoku do 20ml fermentačních vialek, které byly uzavřeny PTFE uzávěrem a aluminiovým krimpovacím víčkem. Po uzavření bylo přes víčko přidáno 0,8 ml redukčního roztoku. Následně bylo přidáno 20 µl testované látky a 2 ml připravené 32% směsi stolice.

V definovaných časových intervalech 0, 2, 4, 8, 24 a 48 h byly z fermentačních nádobek přes septum odebírány vzorky (3 ml) pro analýzu do plastových zkumavek. Fermentace probíhala na horizontální třepačce (Heidolph 100, DE) při tělesné teplotě 37 °C a s frekvencí třepání 100/min. Vzorky pro analýzu byly uchovávány při teplotě -80 °C.

4.5 LC/MS analýza

4.5.1 Příprava vzorků

Fermentované vzorky byly před odebráním pro extrakci centrifugovány (centrifuga Rotanda 460R, DE) po dobu 5 minut (15 tis. rpm). Do 15ml centrifugačních plastových zkumavek bylo přidáno 2 ml vody, 2,5 ml ethylacetátu a 20 µl značeného resveratrolu C13 o koncentraci 2 µg/ml. Následně bylo přidáno 0,4 ml fermentovaného vzorku. Zkumavky byly centrifugovány 5 min (4 600 rpm). Před centrifugací byly zkumavky zvortexovány. Po odstředění byla odebrána vrchní ethylacetátová vrstva do nových zkumavek. V dalším kroku bylo ke zbývající vodné vrstvě v původních zkumavkách opět přidáno 2,5 ml ethylacetátu a 2 ml vody. Zkumavky byly znovu centrifugovány 5 min (4 600 rpm) a opět byla odebrána ethylacetátová vrstva, která byla přidána k předchozí ethylacetátové fázi. Ethylacetát byl odpařen plynným dusíkem. Po odpaření byl suchý vzorek rozpuštěn v 1 ml MeOH s 1% kyselinou mravenčí. Jako kontrola byly použity vzorky stolice bez testovaných látek. Dále byly proměřeny směsi standardů testovaných látek a byla provedena kontrola kvality (QC).

4.5.2 Podmínky analýzy

Měření probíhalo na přístrojích UPLC Ultimate 3000 (Thermo Fischer Scientific, USA) a Q-TOF Impact II (Bruker Daltonik, DE). Byla použita kolona Kinetex 1,7 mm F5 100 Å 100×2,1 mm (Phenomenex, USA). Jako mobilní fáze byla použita směs UPLC vody (mobilní fáze A) a voda s 0,1 % kyseliny mravenčí (mobilní fáze B). V čase 0 byl průtok fází A a B v poměru 8:2. Ve třetí minutě byl poměr fází 1:1. Mezi šestou a patnáctou minutou protékala pouze fáze B. Mezi patnáctou a šestnáctou minutou byl poměr upraven na 8:2. V tomto poměru byl udržován do konce analýzy. Doba analýzy činila 20 minut. Teplota kolony byla 35 °C. Autosampler byl chlazen na 10 °C. Nástřik byl 5 µl. Rychlost průtoku byla 0,2 ml/min. Analýza v hmotnostním spektrometru probíhala v negativním módu za následujících podmínek: endplate offset -500 V, capillary voltage 3 kV, tlak nebulizačního plynu 30 kPa, průtok sušícího plyn 4 l/min, teplota zdroje 250 °C. Před MS analýzou byla provedena kalibrace na formát sodný. Měření byla prováděna v režimu Full Scan. Snímání spekter probíhalo v rozsahu 500–1500 m/z frekvencí 1 Hz.

4.6 GC/MS analýza

4.6.1 Příprava standardů a vzorků

Směs standardů (STD) byla připravena napipetováním 100 µl od každé látky do odměrné baňky, která byla následně doplněna methanolem do celkového objemu 5 ml. Byly použity výchozí zásobní methanolvé roztoky standardů o koncentraci 10 mg/ml. Výsledná koncentrace směsi standardů byla 0,2 mg/ml. Jako interní standard byla použita 2,4,5-trimethoxyskořicová kyselina v koncentraci 0,2 mg/ml (v methanolu). Kalibrační řada standardů byla připravena pro každé měření metodou sériového ředění v následujících koncentracích: 24,000 µg/g, 15,840 µg/g, 10,454 µg/g, 6,900 µg/g, 4,554 µg/g, 3,006 µg/g, 1,984 µg/g, 1,309 µg/g, 0,864 µg/g, 0,570 µg/g a blank. Methanol byl ze vzorku odpařen na SpeedVacu. Po odpaření bylo napipetováno do všech zkumavek 400 µl vody. V dalších krocích byly standardy upravovány stejným způsobem jako vzorky. Rozmražené vzorky z fermentací byly napipetovány do zkumavek v objemu 400 µl. Do každé zkumavky byl napipetován jeden vzorek. Do všech zkumavek včetně standardů bylo přidáno 30 µl interního standardu. Vzorky byly zvortexovány a dále bylo do všech zkumavek přidáno 60 µl 1M HCl. Vzorky byly zvortexovány a uloženy na 10 min do lednice.

Extrakce byla provedena ve dvou opakováních následujícím způsobem: do všech zkumavek bylo přidáno 1,5 ml ethylacetátu. Zkumavky byly vortexovány po dobu 30 s a následně centrifugovány 10 min (3 000 rpm, 4 °C). Vrchní ethylacetátová vrstva byla převedena do skleněných vialek. Rozpouštědlo bylo odpařeno na SpeedVacu miVac duo concentrator (Genevac, UK) při 45 °C do sucha. Při následné derivatizaci bylo do všech vialek přidáno 50 µl derivatizačního činidla N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroatedamide (BSTFA) + 1 % trimethylsiloxane (TMCS). Vialky byly před a po aplikaci činidla vyfoukány dusíkem. Derivatizace probíhala 2 h při teplotě 65 °C. Poté byly vialky uchovávány až do měření při laboratorní teplotě. Před měřením byl do každé vialky přidán hexan v objemu 400 µl.

4.6.2 Podmínky analýzy

Analýza byla provedena na plynovém chromatografu Agilent 7890BGC (Agilent, USA) s hmotnostním spektrometrem Agilent 7200 Accurate Mass Q-TOF (Agilent, USA). Pro řízení analýzy byl použit software GC-MS Masshunter (verze 4.11) (Agilent, USA). Nástřik vzorku byl 1 µl (split mód 1:50). Byla použita nepolární kapilární kolona HP-5 MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm) (Agilent, USA). Jako nosný plyn bylo použito helium o průtoku 1,2 ml/min. Teplotní program byl nastaven: 80 °C (0,2 min) – 20 min gradient 12 °C/min – 320 °C (10 min), celkový čas tedy činil 30,2 min. Teplota na transfer line byla 310 °C a teplota ionizačního zdroje byla 230 °C. Analýza probíhala ve scan mode režimu při pozitivní ionizaci. Snímkování spekter probíhalo v rozsahu 50–700 m/z s frekvencí 6,25 Hz. Energie emitovaných elektronů byla 70 eV, emisní proud 35,0 µA. Sběr dat byl zahájen ve druhé minutě.

4.6.3 Vyhodnocování výsledků

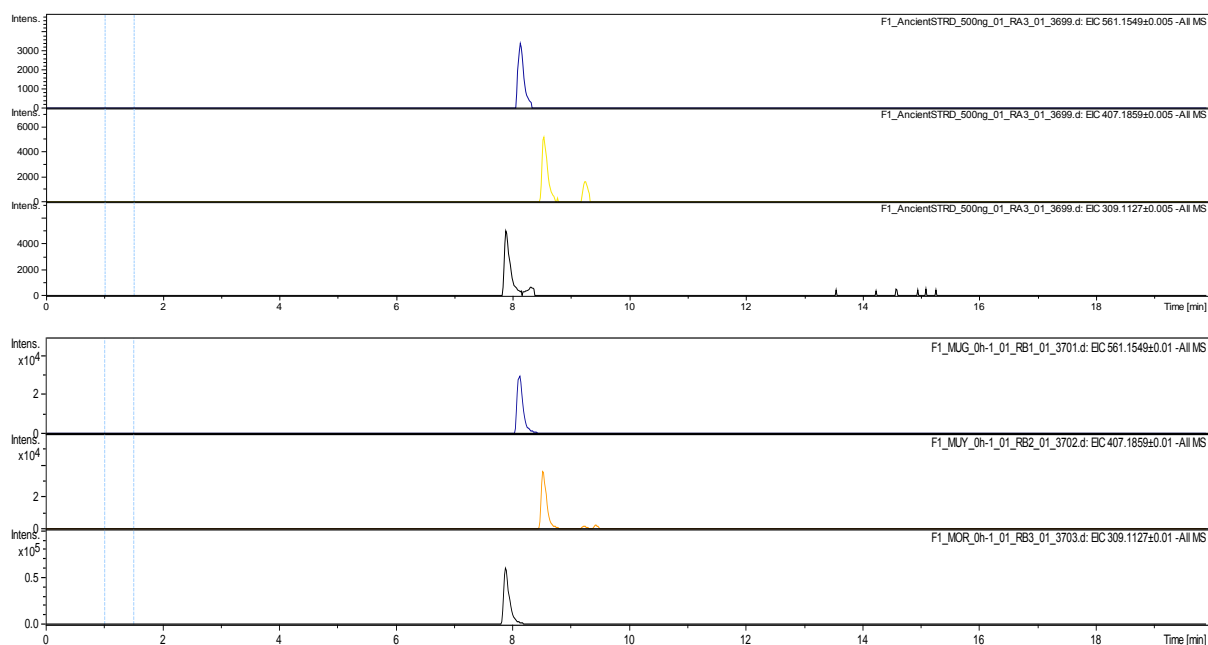
Data z LC analýzy byla vyhodnocena pomocí programu DataAnalysis 4.3 (Bruker Daltonik, DE). Výsledky byly získány ze třech opakování. Pro sběr, vyhodnocení dat při GC-MS analýze byl použit software GC-MS Masshunter (verze 4.11). Měření na GC/MS byla provedena ve dvou opakováních. K hledání metabolitů byl dále použit program XCMS online (Scripps Research Institute, USA).

5 Výsledky a diskuze

5.1 Cílová analýza LC/MS

5.1.1 Identifikace testovaných látek

Identifikace testovaných látek byla provedena na základě srovnání se standardy v programu DataAnalysis (graf 1). V prvních třech horních řádcích jsou zobrazeny peaky zachycených standardů testovaných látek. Na spodních třech řádcích jsou zobrazeny testované látky v čase fermentace 0 h ve stejném pořadí jako standardy. V tabulce níže jsou zaznamenány naměřené retenční časy a m/z testovaných látek.



Graf 1: Chromatogram zachycující sledované látky. Řádky 1 a 4: mulberrofuran G, řádky 2 a 5: mulberrofuran Y, řádky 3 a 6: moracin C.

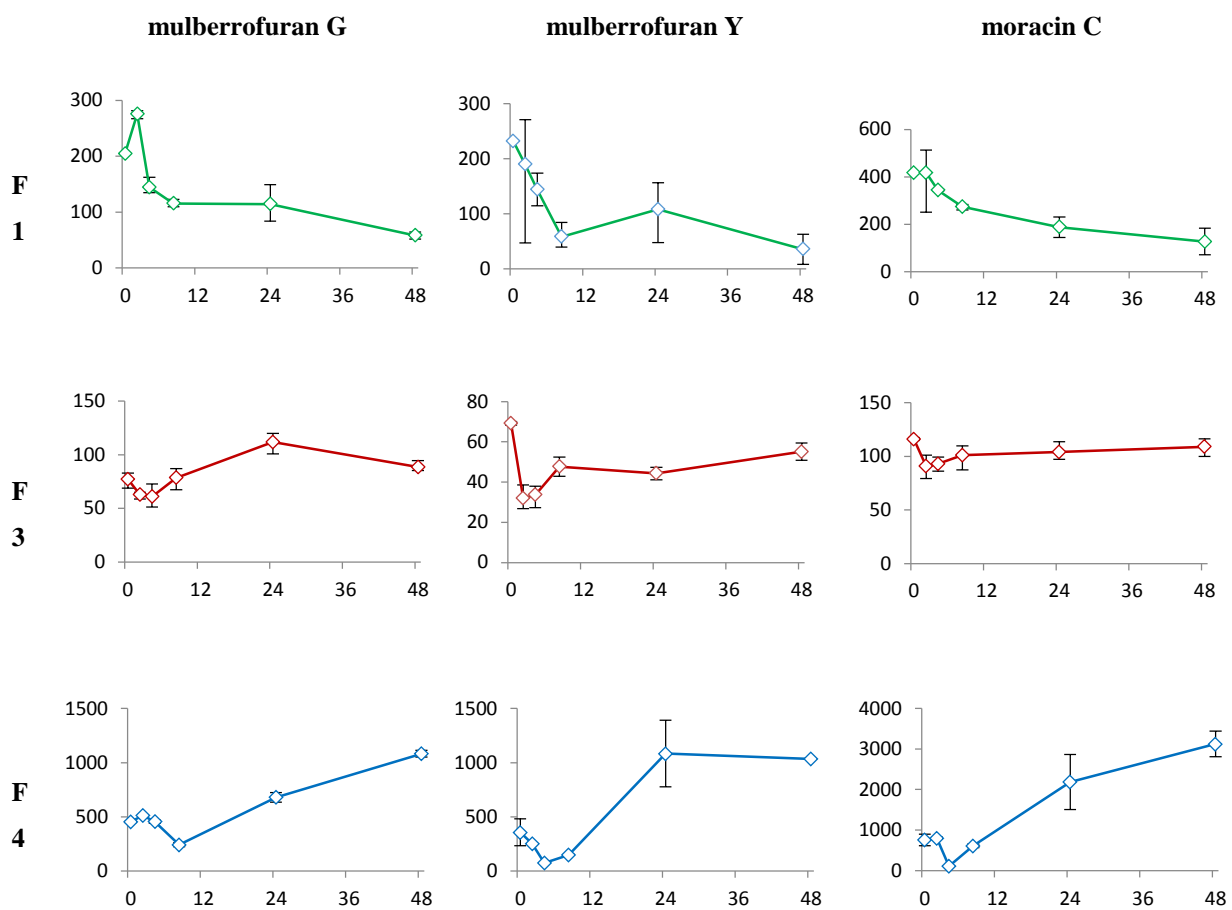
Tabulka 2: Naměřené hodnoty retenčního času a hmotnosti.

Název látky	Retenční čas (min)	m/z
mulberrofuran G	8,2	562,1628
mulberrofuran Y	8,6	408,1937
moracin C	7,9	310,1205

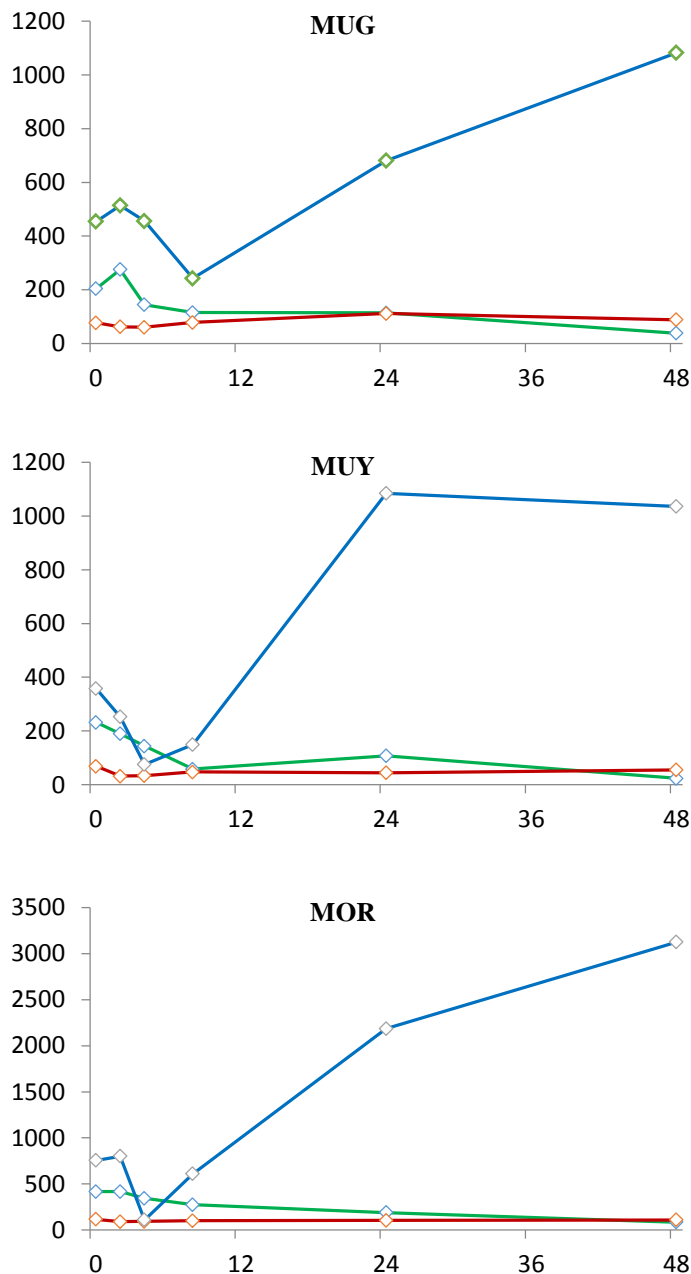
5.1.2 Vývoj intenzity testovaných látek v čase

Byla sledována změna intenzity odezvy u testovaných látek. Následující soubor grafů (graf 2) zobrazuje intenzitu testovaných látek ve vyznačených časových úsecích. Chybové úsečky představují střední chybu průměru jednotlivých měření. U dárce F1 všechny tři testované látky vykazovaly snížení intenzity s průběhem fermentace. U dárce F3 nebyl zaznamenán výrazný úbytek mezi časy 0–48 h. V porovnání s dárce F1 však není mezi těmito dárce příliš velký rozdíl, jak je patrné ze souboru grafů (graf 3). U dárce F4 byl nejprve zaznamenán pokles, který u mulberrofuranu Y a u moracinu C trval do 4. hodiny a u mulberofurranu G do 8. hodiny. Následně byl zaznamenán výrazný nárůst v odezvě, která ve 48. hodině převyšovala odezvu počáteční koncentrace (v hodině 0). Nejvyšší odezva při měření byla zaznamenána u moracinu C u všech dárce. Lišila se také odezva mezi měřeními jednotlivých dárce. Nejvyšší odezva byla zaznamenána u dárce F4, a to u všech testovaných látek. U dárce F1 a F3 byl rozdíl v intenzitě nižší, ale i zde je pozorován rozdíl, který u všech testovaných látek vykazuje stejný trend.

Obecně nejnižší odezva byla získána při měření dárce F1. Příčinou těchto rozdílů může být vliv média obohaceného o střevní mikrobiotu a její doprovodné látky. Tyto složky jsou individuální a z hlediska povahy metodiky nelze tento vliv vyloučit. Grafické výstupy naznačují, že metabolismus testovaných látek probíhá u jednotlivých dárce různým způsobem s odlišnou mírou rozkladu.



Graf 2: Přehled metabolismu testovaných látek u jednotlivých dárců. (osa x – čas (h), osa y – plocha peaku).



Graf 3: Srovnání metabolismu testovaných látek mezi jednotlivými dárce. Barevná legenda odpovídá předchozímu grafu.

Tento fakt je v souladu s poznatky v literatuře (Scalbert *et al.*, 2002). Dárce F1 vykazoval způsob rozkladu dle předpokladu, kdy vlivem doby fermentace se snižovala koncentrace testované látky v médiu. Tento způsob rozkladu odpovídá rozkladu jiných polyfenolových sloučenin v podobných *in vitro* fermentacích (Rechner *et al.*, 2004). Existuje předpoklad, že úbytek látek je způsoben činností bakterií ze stolice dárce přidaných do média. V takovém případě je úbytek testované látky spojen s nárůstem metabolitu dané látky v médiu. U dárce

F3 nebyla zaznamenána významná změna v koncentraci na počátku a na konci fermentace, což může znamenat, že mikrobiota tohoto dárce dané látky nerozkládá. U dárce F4 byl nejprve zaznamenán pokles a následně byl v druhé polovině fermentace zaznamenán výrazný nárůst koncentrace, čímž se tento dárce významným způsobem odlišuje od dárců F1 a F3 a tento způsob průběhu fermentace je v rozporu s původním předpokladem. Pravděpodobně se nejedná o chybu v měření, protože výsledky vykazují stejný charakteristický trend rozkladu u všech látek i opakování.

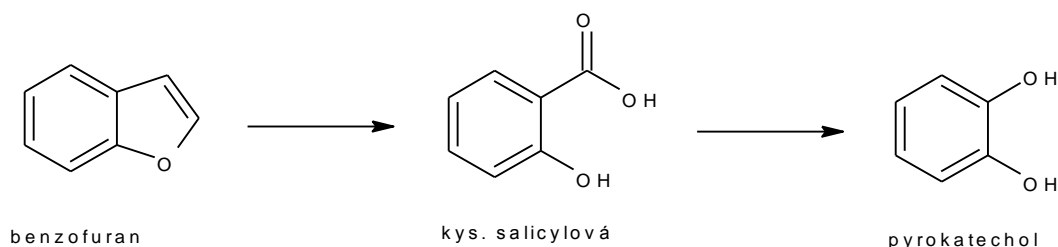
Variabilita ve výsledcích mezi jednotlivými dárci může být obecně vysvětlena rozdílným složením střevní mikrobioty jednotlivých dárců (Rechner *et al.*, 2004). Charakteristický trend rozkladu u dárce F4 by mohl být ovlivněn vazbou testovaných látek na nějakou složku média, což by znemožňovalo vyhledání testované látky podle její m/z. Dle dostupných zdrojů v literatuře je běžné vázání polyfenolových látek především na bílkoviny a polysacharidy. Phan *et al.* (2015) uvádí, že polyfenolové látky se mohou velmi rychle vázat na celulózu. Výrazný vznik vazeb je možné pozorovat již od první minuty po interakci, přičemž během prvních 30 minut je pozorován nejprudší nárůst, který trvá zhruba dvě hodiny. Poté již k nárůstu nedochází. Jakobek (2015) popisuje různé typy vazeb mezi polyfenoly a proteiny, které jsou běžné. Jak pro vazby se sacharidy, tak s proteiny existují společné charakteristiky, které zvyšují sílu i množství vazeb dle vlastností dané fenolové látky. Obecně se váží lépe látky s vyšší molekulovou hmotností a větším množstvím OH skupin (Jakobek, 2015). Pro teorii vazby testovaných látek na nějakou složku média u dárce F4 svědčí počáteční nízká koncentrace a následný pokles testovaných látek v prvních hodinách fermentace. Pozorovaný vzestup v pozdějších hodinách fermentace by poté svědčil pro postupné uvolnění vazby.

Míra rozkladu je kromě složení střevní mikrobioty dárce také ovlivněna strukturou testované látky a její schopnosti odolávat rozkladu. Oberoi, Philip and Bhallamudi (2015) uvádí, že samotný benzofuran, který tvoří skelet testovaných látek, je látkou velmi odolnou mikrobiálnímu rozkladu. V experimentu, který zahrnoval především aerobní mikroorganismy, trval rozklad benzofuranu 216–288 hodin v závislosti na druhu mikrobiální kultury. Je však nutno brát v potaz, že 2-arylbenzofurany jsou molekuly substituované, což může významně ovlivnit mikrobiální rozklad (Celep, Rastmanesh and Marotta, 2013).

5.1.3 Hledání potenciálních metabolitů

Potenciální metabolity byly vytipovány na základě poznatků v literatuře, jak bylo popsáno výše v kapitole 3.3.5. Byly hledány metabolity mírně pozměněné reakcemi, které jsou typické

pro mikrobiální rozklad, jako jsou produkty víceúrovňové dehydroxylace, redukce, demethylace a deprenylace. Dále byly hledány produkty glukuronidace, sulfatace, metylace nebo hydroxylace. Metabolity byly hledány na základě jejich m/z a na základě m/z jejich předpokládaných aduktů v programu DataAnalysis. Tímto způsobem však nebyly nalezeny žádné potenciální metabolity.



Obrázek 8: Rozklad benzofuranu podle (Oberoi et al., 2015).

Dle dostupných zdrojů je velice pravděpodobné, že sloučeniny obsahující benzofuran se štěpí na kyslíkové vazbě v heterocyklu (Monna, Omori and Kodama, 1993; Oberoi, Philip and Bhallamudi, 2015). Oberoi et al. (2015) uvádí, že produktem mikrobiální degradace samotného benzofuranu může být až $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ při aerobním rozkladu. Jako meziproducty tohoto rozkladu uvádí katechol a kyselinu salicylovou, což jsou sloučeniny, které byly nalezeny při mikrobiálním rozkladu bakteriemi střevní mikrobioty u řady polyfenolových sloučenin (Seo, Keum and Li, 2009). Monna et al. (1993) uvádí schéma rozkladu dibenzofuranu, kdy dibenzofuran je štěpen opět od kyslíku v heterocyklu. Vznikají při tom 2-hydroxybenzoová kyselina a 2,5-dihydroxybenzoová kyselina. Na základě výše popsaných poznatků z literatury bylo dále vytipováno několik metabolitů, které by mohly vznikat vlivem štěpení benzofuranu způsobem popsaným výše. Obdobným způsobem popsaným dříve byly hledány následující látky: 4-hydroxybenzoová kyselina, 3,5-dihydroxybenzoová kyselina, protokatechová kyselina, resorcinol (benzen-1,3-diol), floroglucinol (benzen-1,3,5-triol). Žádný z vytipovaných metabolitů se nepodařilo vyhledat.

Při vyhodnocování přítomnosti potenciálních metabolitů danou metodou je nutno zohlednit rozsah metabolitů, které mohou být danou metodou stanoveny. Na účinnost extrakce metabolitů má významný vliv druh rozpouštědla. Jako rozpouštědla pro extrakci polyfenolových látek jsou používány různé látky. Rozpouštědlo by mělo být voleno vždy dle polarity extrahované látky, což může být obtížné, pokud jsou extrahovány různé druhy látek v jednom experimentu. Pro extrakci v této práci zkoumaných 2-arylbenzofuranů byl použit ethylacetát, který je z hlediska polarity středně polární rozpouštědlo, které není vhodné pro velmi polární látky. Je možné, že pokud by vznikaly velmi polární metabolity, nemusely by

být ethylacetátem vyextrahovány. V literatuře se uvádí, že jednoduché fenolové kyseliny mohou být ethylacetátem extrahovány, což se také potvrdilo při extrakci standardů pro GC/MS. Z vtypovaných metabolitů mají kyselina 4-hydroxybenzoová a kyselina 3,5-dihydroxybenzoová předpokládanou rozpustnost ve vodě 1,9 g/l a 12 g/l. Floroglucinol má rozpustnost 35,8 g/l. Resorcinol má však velmi vysokou rozpustnost, 82,3 g/l. Lze tedy předpokládat, že při použité LLE extrakci by značná část přešla do vodné fáze. Naopak testované látky jsou svou povahou látky spíše nepolární, avšak dle dostupné literatury je lze extrahovat i polárnějšími rozpouštědly, např. metanolem (Gundogdu *et al.*, 2011). Pro srovnání: index polaritý ethylacetátu je 4,4, index polaritý methanolu je 5,1. Je tedy možné, že hledané metabolity s vyšším indexem polaritý nemusely být detekovány z důvodu nedostatečné extrakce. Metoda použitá v této práci byla zvolena na základě zkušenosti s použitím této metody u strukturně a biologicky příbuzných stilbenoidů, kde jsou však spíše předpokládány metabolity rozkladu na základě jednoduchých reakcí, jako jsou dehydroxylace a další, jak již bylo popsáno výše.

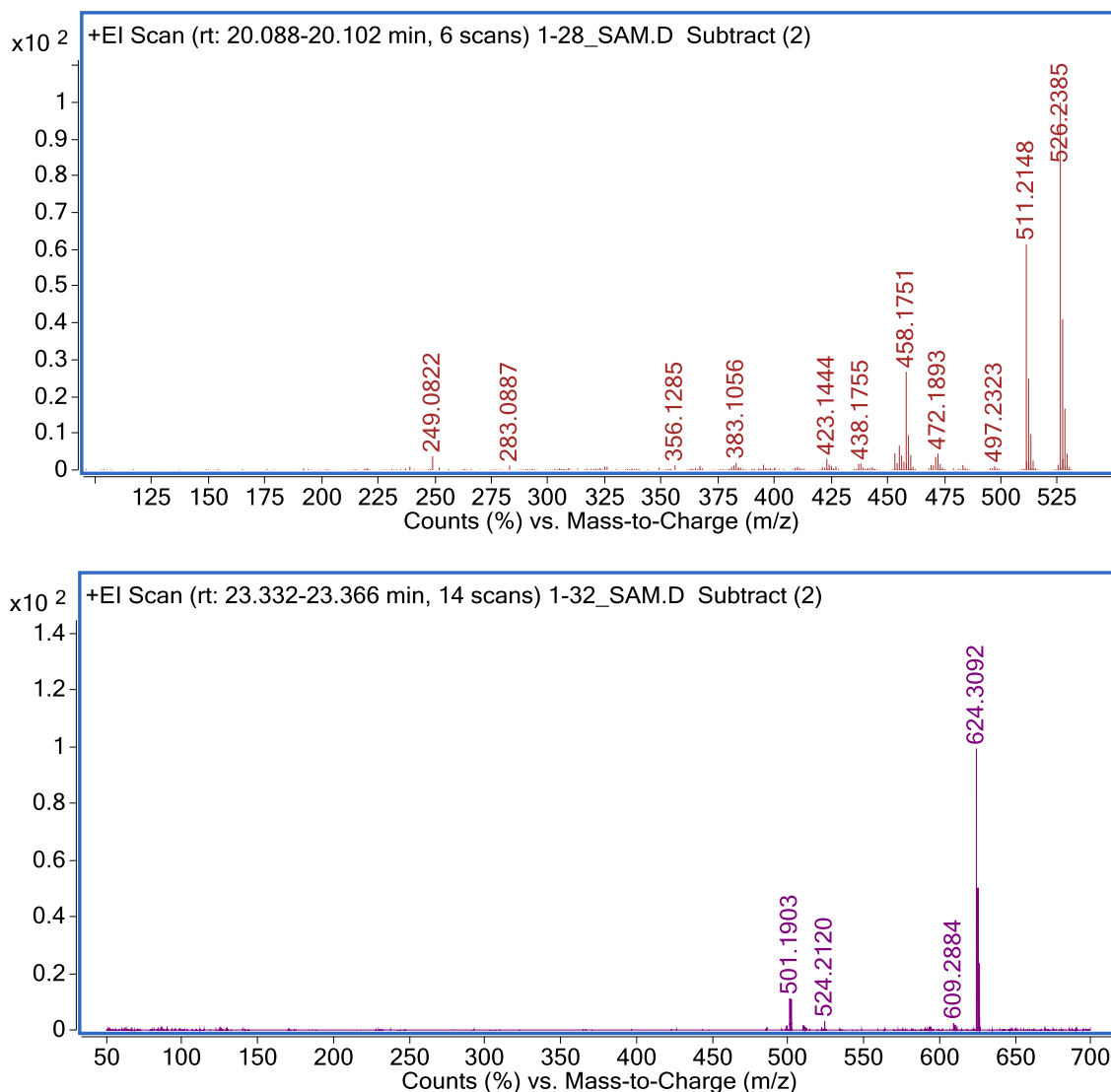
5.2 GC/MS analýza

5.2.1 Identifikace testovaných látek

Dle literatury je z analytických metod pro separaci a identifikaci fenolových sloučenin nejvíce využívána metoda HPLC s tím, že výhoda spočívá v tom, že je schopna dobře analyzovat molekuly, které mají rozmanitou strukturu skládající se z hydrofilních glykosidů a hydrofobních aglykonů (Stalikas, 2007). Analýza pomocí GC/MS po derivatizaci TMS byla provedena proto, že je do značné míry s LC/MS komplementární. Umožňuje dobrou separaci derivátů fenolových kyselin, které jsou často uváděny jako hlavní produkty katabolismu rostlinných polyfenolů. Tyto polární látky jsou v rychlém lineárním gradientu LC/MS, používaném při metabolické analýze, eluovány na začátku gradientu, často spolu s peakem rozpouštědla a mohou tak uniknout pozornosti.

TMS deriváty použitých mulberrofuranů mají vyšší molekulovou hmotnost, navýšenou o silanové jednotky, které se váží místo vodíků v hydroxylových a karboxylových skupinách molekul. TMS deriváty mulberrofuranů jsou znázorněny na obrázku 7 v kapitole 4.1. Byla zavedena metoda na cílenou analýzu 17 potenciálních TMS-derivátů fenolových kyselin a testovaných látek použitých ve fermentacích. Molekulová hmotnost TMS derivátu

mulberrofuranu G byla 926.3553 Da a tento derivát tedy nemohl být pomocí GC/MS detekován.



Obrázek 9: Spektra testovaných látek (nahore: moracin C, dole: mulberrofuran Y).

Ani pomocí cílené analýzy GC/MS nebyly identifikovány žádné metabolity, které by souvisely s přidavkem testovaných látek do fermentací. Přestože řada TMS derivátů fenolových kyselin byla identifikována (např. L-3-fenylactová kys., 3,4-dihydroxykořičová kys. nebo 3-hydroxyfenylactová kys.), tyto metabolity jsou tvořeny v důsledku fermentace média, často z prekurzorů aromatických aminokyselin a nebyly průkazně odlišné mezi vzorky z fermentace s přidavkem testovaných látek a odpovídajících kontrol. Lze tedy z výsledků usuzovat na to, že testované látky nejsou rozkládány na očekávané fenolové kyseliny tak jako jiné příbuzné polyfenoly. To je do jisté míry v rozporu s obecným tvrzením, že fenolové kyseliny jsou hlavními metabolity polyfenolů v tlustém střevě. Dle současné literatury je

většina dieteticky významných polyfenolů jako jsou 2-arylbenzofuranům příbuzné antokyany a flavonoly v gastrointestinálním traktu nestabilní a nerozložené aglykony jsou vstřebávány pouze v malém množství (Rechner *et al.*, 2002).

Kyseliny, které byly použity pro standardy, jsou nalézány jako produkty metabolismu řady běžných polyfenolů. Například deriváty fenyloctové kyseliny vznikají z hydroxycinamátů, což jsou látky, mezi které patří prekurzory 2-arylbenzofuranů (Gómez-Juaristi *et al.*, 2018). Deriváty benzoové kyseliny mohou vznikat jako produkty dalšího metabolismu derivátů fenyloctové kyseliny (Stevens and Maier, 2016). Mezi hydroxycinamáty dále patří kyselina kávová a hipurová, které byly rovněž součástí standardů. Kyselina hipurová je spíše vylučována močí, ale je také součástí produktů metabolismu tlustého střeva (Rechner *et al.*, 2002). Významnou kyselinou, která je rozšířeným produktem metabolismu řady polyfenolů, je protokatechová kyselina (Dall'Asta *et al.*, 2012). Tato kyselina nebyla součástí sady standardů, avšak byla hledána v rámci LC/MS analýzy, kde byly nalezeny pouze nízké koncentrace, které nesouvisely s jejím výskytem jakožto produktu metabolismu testovaných látek.

Chromatogramy z GC/MS byly dále analyzovány v aplikaci XCMS na rozdílovou analýzu. Ani tento přístup nevedl k nalezení potenciálních metabolitů, které by byly asociovány s přídatkem testovaných látek. Analýza byla proto provedena znovu s daty z LC/MS.

Tabulka 3: Retenční chování a hmoty TMS derivátů testovaných látek a standardů fenolových kyselin.

rt	Standard	Molekulární iont	Base peak	Další fragmenty		
9,558	PLA	295,1188	193,1052	267,1237	220,0918	140,0664
9,708	3HPAA	296,1263	164,0655	281,1028	252,1369	147,0658
9,837	PVA	235,1244	160,0852	217,0983	142,075	132,0904
9,844	4HBA	282,1108	267,0908	223,0998	193,0686	207,0661
9,940	neznámý	296,1271	179,0918	281,1034	252,138	164,066
10,61	3HPPA	310,1418	205,0686	192,0686	177,0734	161,0414
10,886	4HPAA	312,1214	297,0996	282,0746	267,0519	253,1079
10,945	3H4MPAA	326,1637	179,0771	311,1295	269,1029	209,1116
11,301	3,4DHBA	370,1468	193,0452	355,1225	311,1323	223,0613
11,384	3,4DPAA	384,1607	179,0529	267,1236	237,0764	369,1366
12,260	2HPVA	338,1730	179,0895	323,1493	248,1228	192,0967
12,552	3M4HBA	310,1232	279,1051	295,0999	236,0862	221,0799
13,365	CA	396,1606	219,0473	381,1367	249,076	191,0522
<4	PAA					
13,770	TMCA	310,1320	279,1267	295,1002	236,0868	221,0827
13,365	3,4DHCA	396,1606	219,0473	381,1367	249,076	191,0522
20,093	MOR	526,2385	526,2385	511,2148	458,1751	427,1893
23,347	MUY	624,3092	624,3092	501,1903	609,2884	524,2120
ND	MUG					

Pozn.: seznam zkratk standardů: PLA: DL3-fenyloctová kys., **3HPAA:** 3-hydroxyfenyloctová kys., **PVA:** 5-fenylvalerová kys., **4HBA:** 4-hydroxybenzoová kys., **3HPPA:** 3-(3-hydroxyfenyl)propionová kys., **4HPAA:** 4-hydroxyfenyloctová kys., **3H4MPAA:** 3-hydroxy-4-methoxyfenyloctová kys., **3,4DHBA:** 3,4-dihydroxybenzoová kys., **3,4DPAA:** 3,4-hydroxyfenyloctová kys., **2HPVA:** 5-(4-hydroxyfenyl)pentanová kys., **3M4HBA:** vanilová kys., **CA:** kávová kys., **PAA:** fenyloctová kys., **TMCA:** 2,4,5-trimethoxyskořicová kys., **3,4DHCA:** 3,4-dihydroxyskořicová kys., **MOR:** moracin C, **MUY:** mulberrofuran Y, **MUG:** mulberrofuran G

5.3 Analýza metabolických produktů rozpadu pomocí software XCMS

V rámci pracovního postupu byly zvoleny dva přístupy k LC/MS analýze. První byla cílová analýza, extrakce chromatogramů na zvolených m/z potenciálních metabolitů, které by mohly vznikat. Tato analýza včetně postupu hledání potenciálních metabolitů byla již podrobně popsána v kapitole 5.1. Byly simulovány reakce demethylace, dehydroxylace a redukce dvojných vazeb na substituentech i rozpad 2-arylbenzofuranu tvořícího základ skeletu molekuly. Žádný z těchto postupů ale nevedl k identifikaci metabolitů s výjimkou mateřských molekul. Obě analýzy LC/MS i GC/MS nasvědčují tomu, že jejich osud ve fermentacích je stabilní. Je možné, že pokud jsou metabolity tvořeny, jejich koncentrace je pod mezí detekce.

Dalším přístupem k hledání potenciálních metabolitů byla rozdílová analýza pomocí software XCMS. Při této analýze byly na dvou vybraných časech hledány rozdílové peaky mezi datasey. V této analýze je datasetem chápán soubor opakování měření. Každý dataset tedy obsahoval tři opakování. Výstupem z programu je seznam tzv. hitů, kde každý z hitů může být potenciálním metabolitem. Tabulka hitů (213 features s $p < 0,001$) byla manuálně prohledána a zkontrolována. Bylo nakonec vybráno 22 hitů, které by mohly být potenciálními metabolity. Další tři hity byly identifikovány jako testované látky (viz tabulka 4). Výřezy rozdílových chromatogramů s těmito features jsou uvedeny v příloze.

Tabulka 4: Seznam hitů potenciálních metabolitů testovaných látek.

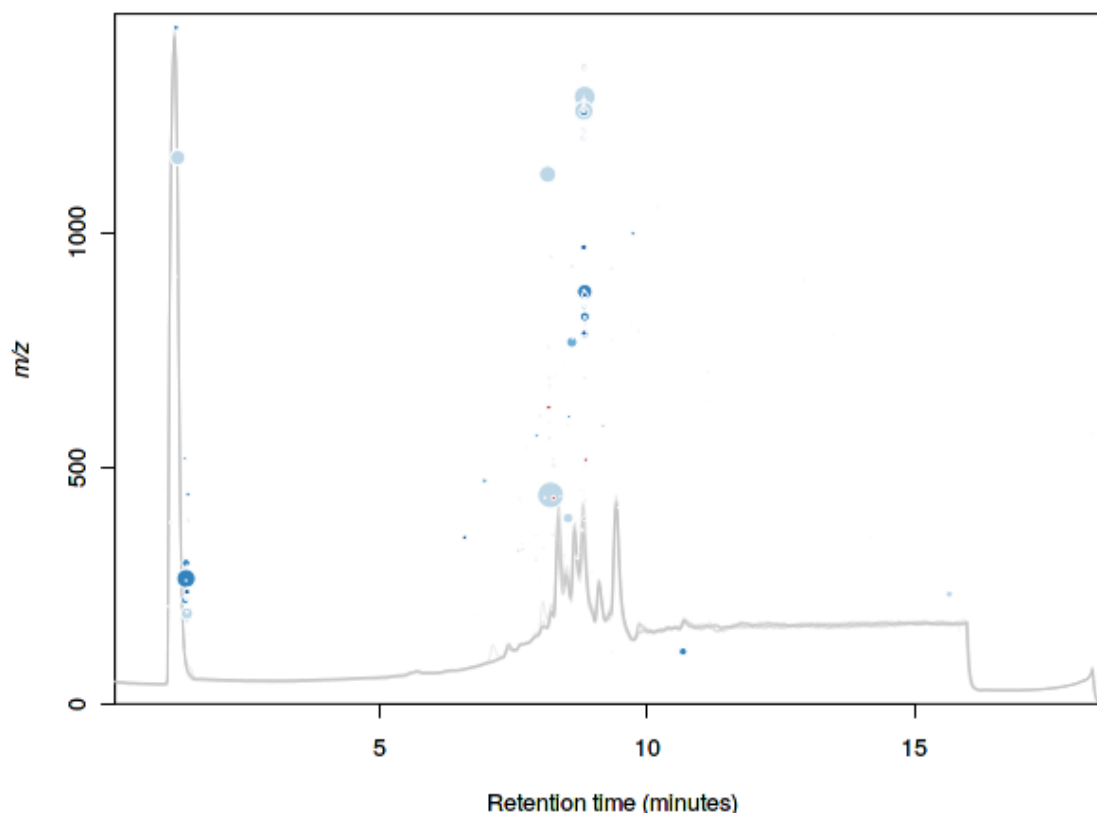
Potenciální hity (METLIN)	mzmed	rtmed	maxint 8 h	maxint 24 h
moracin C	310,1111	7,91375	8127	7242
neznámý metabolit moracinu C	220,0174	1,34895	8424	5231
neznámý metabolit moracinu C	263,0596	1,357108	1498	1398
neznámý metabolit moracinu C	266,0223	1,365717	4844	3279
benzyl sulfát, p-tolyl sulfát, p-kresol sulfát	222,9807	1,365717	17402	8911
neznámý metabolit moracinu C	238,0277	1,381783	1276	901
chlorobenzoová kyselina	176,9759	1,381783	21137	10181
fenolový fosfát	194,9868	1,382967	3309	1725
chlorofenol	148,9810	1,396967	2657	1346
neznámý metabolit moracinu C	248,0122	1,399067	799	745
neznámý metabolit moracinu C	325,1025	7,585550	5361	2269
adukt moracinu C	355,1124	7,913750	1456	1146
neznámý metabolit moracinu C	438,1568	8,241917	2366	1259
neznámý metabolit moracinu C	505,1398	8,241917	707	432
mulberrofurán G	562,1518	8,155450	6415	7369
adukt mulberrofuránu G	597,1246	8,155450	2218	2495
adukt mulberrofuránu G	629,1342	8,155450	2363	2725
adukt mulberrofuránu G	691,1034	8,155450	1063	905
neznámý metabolit mulberrofuránu G	1219,815	8,499583	707	ND
neznámý metabolit mulberrofuránu G	1353,777	8,812117	901	1353
neznámý metabolit mulberrofuránu G	1256,790	8,812700	2143	3988
neznámý metabolit mulberrofuránu G	873,5345	8,829350	6856	8165
neznámý metabolit mulberrofuránu G	693,2008	9,157650	1665	2113
mulberrofurán Y	407,1808	8,552867	13193	18361
neznámý metabolit mulberrofuránu Y	455,2351	8,760250	14131	42640

Pouze několik málo hitů má m/z nižší než mateřská molekula. Tyto mohou být produkty rozpadu. Některé z nich (m/z 220,0174; 263,0596; 226,0223; 222,9807; 238,0277; 176,9759; 194,9868; 148,9810; 248,1022) mají eluční čas blízký elučnímu času rozpouštědla

a téměř nulovou retenci na koloně. Mohlo by se jednat o substituovaná benzenová jádra o nízké molekulární hmotnosti, organické kyseliny, které nebyly součástí setu standardů pro cílenou GC/MS analýzu, nebo polární látky. Většina hitů zobrazených v tabulce 4 se vyskytovala jak v 8. hodině, tak i v 24. hodině. Většina potenciálních metabolitů z tabulky hitů patří moracinu C. Ten je ze všech tří testovaných látek svojí strukturou nejjednodušší, čímž se do značné míry výrazněji liší od zbývajících dvou sloučenin. Je možné, že toto má vliv na jeho stabilitu a rozklad.

Potenciální metabolity byly vyhledávány v databázi METLIN, která je součástí programového balíku XCMS. Databáze poskytla několik smysluplných návrhů jako jsou chlorobenzoová kyselina, chlorofenol, fenolový fosfát, benzylsulfát, *p*-tolylsulfát, *p*-kresolsulfát. Výskyt chlorovaných sloučenin je pravděpodobně způsoben tím, že chlor zde tvoří adukt, který vzniká při ionizaci ve zdroji při měření v negativním módu. Mnoho nalezených hitů má molekulární hmotnost vyšší než mateřská molekula. Takto velké molekuly většinou nelze identifikovat pomocí knihovny. Může se jednat o mateřské molekuly nebo jejich metabolity vázané na jiné molekuly. Mohlo by se také jednat o polymery, které jsou běžně nacházeny u jiných polyfenolů, například u flavonolů (Stevens and Maier, 2016). Tvorba polymerů byla doložena i u molekul obsahujících benzofuranový skelet (Khanam and Shamsuzzaman, 2015). Mechanismus vazby byl již detailněji popsán v kapitole 5.1. Mohlo by se také jednat o látky, které s fermentací testovaných látek nesouvisí. K ověření toho, zda nalezené potenciální metabolity opravdu vznikají z testovaných látek, je třeba dalšího výzkumu.

Cloud Plot 213 features with p-value ≤ 0.001



Obrázek 10: Ukázka workflow v programu XCMS, tzv. Metabolomic Cloudplot. Nad TIC chromatogramem jsou znázorněny body o různém průměru, kdy velikost bodu odpovídá velikosti plochy pod peakem, intenzita barvy hodnotu p rozdílové analýzy a na ose y je uvedeno m/z. Obrázek jasně ukazuje, že rozdílné features o nízkém m/z jsou přítomny na patě solvent peaku, zatímco v delších retenčních časech se vyskytují větší konjugáty a polymery látek. Toto grafické vyjádření pomáhá orientovat se při výběru perspektivních features.

6 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo přispět k objasnění metabolismu 2-arylbenzofuranů v tlustém střevě. K tomu byla použita modelová *in vitro* fermentace. Následně byly provedeny dvě komplementární analýzy metodami LC/MS a GC/MS. Pomocí obou analýz byly identifikovány všechny tři testované látky. Z výstupů analýz byla získána hmotnostní spektra testovaných látek, která mohou dále vodítkem pro jiné studie zabývající se výzkumem 2-arylbenzofuranů. Spektra 2-arylbenzofuranů nejsou zatím k dispozici v dostupných knihovných spekter.

Je předpokládána jistá míra rozkladu 2-arylbenzofuranů podobně jako je tomu u jiných strukturně podobných či biochemicky příbuzných polyfenolů. Chování testovaných 2-arylbenzofuranů se však v mnohém od ostatních polyfenolů liší. Významným rozdílem je fakt, že nebyl zaznamenán vznik fenolových kyselin, které jsou produktem katabolismu nutričně významných polyfenolů. Nebyly taktéž objeveny předpokládané metabolity dehydroxylace, redukce, demethylace, deprenylace, glukuronidace, sulfatace, metylace nebo hydroxylace, které jsou v metabolismu polyfenolů také běžné. Pomocí metabolomického programu XCMS bylo vyhledáno několik potenciálních metabolitů. Potvrzení jejich přítomnosti je rozsahem nad rámec této práce.

2-Arylbenzofurany stejně tak jako jiné deriváty benzofuranů jsou biologicky aktivní látky s potenciálem využití v medicíně. V případě 2-arylbenzofuranů je i potenciál pro využití v potravinářství. Pro zachování farmaceutického účinku je žádoucí, aby dané látky vykazovaly co největší stabilitu v trávicím traktu. Dieteticky významné polyfenoly vykazují obecně nízkou stabilitu. Většina účinků na lidské zdraví, která je dáována do souvislosti s konzumací polyfenolů, je tak výsledkem pouze malého počtu jednoduchých fenolových kyselin, které vznikají z polyfenolových prekurzorů. V případě testovaných 2-arylbenzofuranů byla naznačena značná odolnost těchto struktur oproti jiným polyfenolům, což může tyto látky zvýhodnit pro využití jejich účinků.

7 Literatura

- Anwar, F. *et al.* (2015) 'Antioxidant and antimicrobial attributes of different solvent extracts from leaves of four species of mulberry', *International Journal of Pharmacology*, 11(7), pp. 757–765. doi: 10.3923/ijp.2015.757.765.
- Aura, A. M. (2005) 'In vitro digestion models for dietary phenolic compounds', *VTT Publications*, (575), pp. 3–107.
- Aura, A. M. (2008) 'Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon', *Phytochemistry Reviews*, 7(3), pp. 407–429. doi: 10.1007/s11101-008-9095-3.
- Beecher, G. R. (2003) 'Introduction to the proceedings of the Third International Scientific Symposium on Tea and Human Health: Role of Flavonoids in the Diet.', *The Journal of nutrition*, 133(10), p. 3244S–3246S. doi: 10.3945/ajcn.113.060186.Am.
- Biasucci, G. *et al.* (2010) 'Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut', *Early Human Development*, 86(SUPPL. 1). doi: 10.1016/j.earlhumdev.2010.01.004.
- Botta, B. *et al.* (2005) 'Prenylated Flavonoids: Pharmacology and Biotechnology', *Current Medicinal Chemistry*, 12(6), pp. 713–739. doi: 10.2174/0929867053202241.
- Bravo, L. (1998) 'Polyphenols : Chemistry , Dietary Sources , Metabolism , and Nutritional Significance', 56(11).
- Cardona, F. *et al.* (2013) 'Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health', *Journal of Nutritional Biochemistry*. Elsevier Inc., 24(8), pp. 1415–1422. doi: 10.1016/j.jnutbio.2013.05.001.
- Celep, G. S., Rastmanesh, R. and Marotta, F. (2013) 'Microbial Metabolism of Polyphenols and Health', in *Polyphenols in Human Health and Disease*, pp. 577–589. doi: 10.1016/B978-0-12-398456-2.00043-8.
- Crozier, A., Jaganath, I. B. and Clifford, M. N. (2007) 'Phenols, Polyphenols and Tannins: An Overview', *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*, (April 2016), pp. 1–24. doi: 10.1002/9780470988558.ch1.
- Cueva, C. *et al.* (2013) 'In vitro fermentation of grape seed flavan-3-ol fractions by human faecal microbiota: Changes in microbial groups and phenolic metabolites', *FEMS Microbiology Ecology*, 83(3), pp. 792–805. doi: 10.1111/1574-6941.12037.
- Cushnie, T. P. T. and Lamb, A. J. (2005) 'Antimicrobial activity of flavonoids', *International*

- Journal of Antimicrobial Agents*, 26(5), pp. 343–356. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002.
- Dall'Asta, M. *et al.* (2012) 'Identification of microbial metabolites derived from invitro fecal fermentation of different polyphenolic food sources', *Nutrition*, 28(2), pp. 197–203. doi: 10.1016/j.nut.2011.06.005.
- Dimitrova, M. P. *et al.* (2015) 'Carbohydrate Composition and Antioxidant Activity of Certain Morus Species', 7(3), pp. 621–627.
- Dolara, P. *et al.* (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(1–2), pp. 237–246. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2005.04.022.
- Duda-Chodak, A. *et al.* (2015) 'Interaction of dietary compounds, especially polyphenols, with the intestinal microbiota: a review', *European Journal of Nutrition*, pp. 325–341. doi: 10.1007/s00394-015-0852-y.
- Frič, P. (2010) 'Ekosystém a Probiotika', 7(11), pp. 408–413.
- Fukai, T., Kaitou, K. and Terada, S. (2005) 'Antimicrobial activity of 2-arylbenzofurans from Morus species against methicillin-resistant Staphylococcus aureus', *Fitoterapia*, 76(7–8), pp. 708–711. doi: 10.1016/j.fitote.2005.06.012.
- Gecgel, U., Velioglu, S. D. and Velioglu, H. M. (2011) 'Investigating some physicochemical properties and fatty acid composition of native black mulberry (Morus nigra L.) seed oil', *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88(8), pp. 1179–1187. doi: 10.1007/s11746-011-1771-6.
- Genovese, C. (2016) 'Antibacterial activity of Morus alba L. leaf extracts', (September).
- Giada, M. de L. R. (no date) 'World's largest Science, Technology & Medicine Open Access book publisher Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power'.
- Gómez-Juaristi, M. *et al.* (2018) 'Absorption and metabolism of yerba mate phenolic compounds in humans', *Food Chemistry*, 240, pp. 1028–1038. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.08.003.
- Guinane, C. M. and Cotter, P. D. (2013) 'Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ', *Therapeutic Advances in*

- Gastroenterology*, 6(4), pp. 295–308. doi: 10.1177/1756283X13482996.
- Gundogdu, M. *et al.* (2011) ‘Determination of fruit chemical properties of *Morus nigra* L., *Morus alba* L. and *Morus rubra* L. by HPLC’, *Scientia Horticulturae*, 132(1), pp. 37–41. doi: 10.1016/j.scienta.2011.09.035.
- Hattori, M. *et al.* (1990) ‘Effect of tea polyphenols on glucan synthesis by glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*.’, *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 38(3), pp. 717–20. doi: 10.1248/cpb.38.717.
- Huber, B. *et al.* (2003) ‘Influence of Polyphenols on Bacterial Biofilm Formation and Quorum-sensing’, *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 58(11–12), pp. 879–884. doi: 10.1515/znc-2003-11-1224.
- Chan, E. W.-C., Lye, P.-Y. and Wong, S.-K. (2016) ‘Phytochemistry, pharmacology, and clinical trials of *Morus alba*’, *Chinese Journal of Natural Medicines*. China Pharmaceutical University, 14(1), pp. 17–30. doi: 10.3724/SP.J.1009.2016.00017.
- Iriti, M. and Faoro, F. (2009) *Bioactivity of grape chemicals for human health.*, *Natural product communications*.
- Jakobek, L. (2015) ‘Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins’, *Food Chemistry*, pp. 556–567. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.12.013.
- Jeandet, P. *et al.* (2012) ‘Metabolic engineering of yeast and plants for the production of the biologically active hydroxystilbene, resveratrol’, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012(June). doi: 10.1155/2012/579089.
- Keppler, K. and Humpf, H. U. (2005) ‘Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora’, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 13(17), pp. 5195–5205. doi: 10.1016/j.bmc.2005.05.003.
- Khanam, H. and Shamsuzzaman (2015) ‘Bioactive Benzofuran derivatives: A review’, *European Journal of Medicinal Chemistry*, pp. 483–504. doi: 10.1016/j.ejmech.2014.11.039.
- Kim, Y. J., Sohn, M.-J. and Kim, W.-G. (2012) ‘Chalcomoracin and moracin C, new inhibitors of *Staphylococcus aureus* enoyl-acyl carrier protein reductase from *Morus alba*.’, *Biol Pharm Bull*, 35(5), pp. 791–795. doi: 10.1248/bpb.35.791.
- Kostic, D. *et al.* (2015) ‘Flavonoids in mulberry fruit Identification of nonanthocyanin phenolics in some’, 26(June 2013), pp. 38–42.

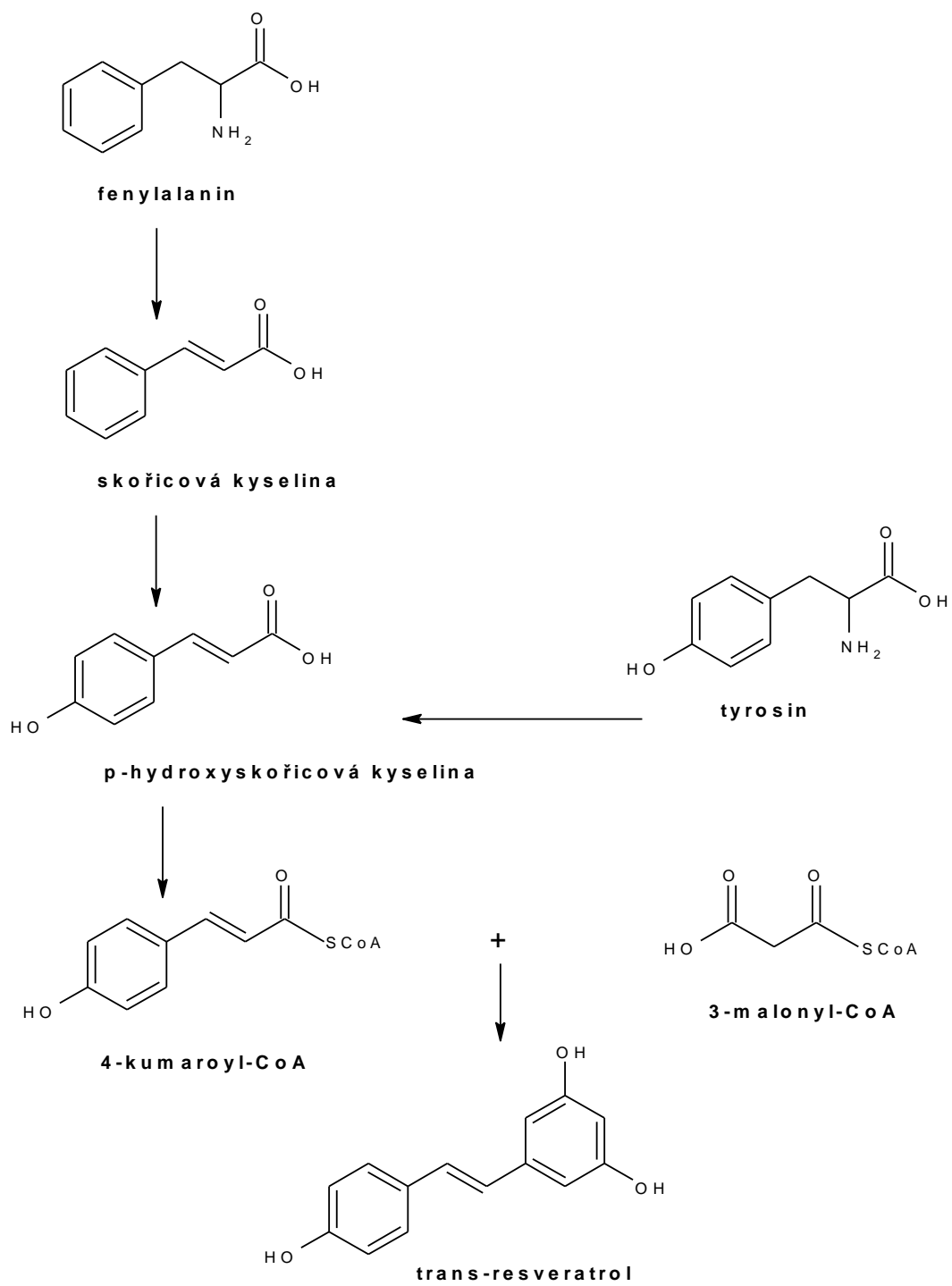
- Laparra, J. M. and Sanz, Y. (2010) 'Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals', *Pharmacological Research*. Elsevier Ltd, 61(3), pp. 219–225. doi: 10.1016/j.phrs.2009.11.001.
- Larrosa, M. *et al.* (2009) 'Effect of a low dose of dietary resveratrol on colon microbiota, inflammation and tissue damage in a DSS-induced colitis rat model', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(6), pp. 2211–2220. doi: 10.1021/jf803638d.
- Lata, J. and Juránková, J. (2011) 'Střevní mikroflóra, slizniční bariéra a probiotika u některých interních chorob', *Interní medicína pro praxi*, 13(2), pp. 63–69.
- Lee, H. C. *et al.* (2006) 'Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota', *Research in Microbiology*, 157(9), pp. 876–884. doi: 10.1016/j.resmic.2006.07.004.
- Łochyńska, M. (2015) 'Energy and Nutritional Properties of the White Mulberry (*Morus alba* L.)', *Journal of Agricultural Science and Technology A*, 5(9), pp. 709–716. doi: 10.17265/2161-6256/2015.09.001.
- Minhas, M. A. *et al.* (2016) 'Evaluation of antibiotic and antioxidant activity of morus nigra (black mulberry) extracts against soil borne, food borne and clinical human pathogens', *Pakistan Journal of Zoology*, 48(5), pp. 1381–1388.
- Monna, L., Omori, T. and Kodama, T. (1993) 'Microbial degradation of dibenzofuran, fluorene, and dibenzo-p-dioxin by *Staphylococcus auriculans* DBF63', *Applied and Environmental Microbiology*, 59(1), pp. 285–289.
- Mueller, N. T. *et al.* (2015) 'The infant microbiome development: Mom matters', *Trends in Molecular Medicine*, pp. 109–117. doi: 10.1016/j.molmed.2014.12.002.
- Nevagi, R. J., Dighe, S. N. and Dighe, S. N. (2015) 'Biological and medicinal significance of benzofuran', *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97(1), pp. 561–581. doi: 10.1016/j.ejmech.2014.10.085.
- Oberoi, A. S., Philip, L. and Bhallamudi, S. M. (2015) 'Biodegradation of Various Aromatic Compounds by Enriched Bacterial Cultures: Part B—Nitrogen-, Sulfur-, and Oxygen-Containing Heterocyclic Aromatic Compounds', *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176(6), pp. 1746–1769. doi: 10.1007/s12010-015-1692-1.
- de Oliveira, A. M. *et al.* (2015) 'Evaluation of Toxicity and Antimicrobial Activity of an Ethanolic Extract from Leaves of *Morus alba* L. (Moraceae)', *Evidence-Based*

- Complementary and Alternative Medicine*, 2015, pp. 1–7. doi: 10.1155/2015/513978.
- Olthof, M. R. *et al.* (2003) ‘Human Nutrition and Metabolism Chlorogenic Acid, Quercetin-3-Rutinoside and Black Tea Phenols Are Extensively Metabolized in Humans 1’, *J. Nutr.*, 133(February), pp. 1806–1814.
- Ozcan, T. *et al.* (2014) ‘Phenolics in Human Health’, *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 5(5), pp. 393–396. doi: 10.7763/IJCEA.2014.V5.416.
- Pandey, K. B. and Rizvi, S. I. (2009) ‘Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease’, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, pp. 270–278. doi: 10.4161/oxim.2.5.9498.
- Parkar, S. G., Trower, T. M. and Stevenson, D. E. (2013) ‘Fecal microbial metabolism of polyphenols and its effects on human gut microbiota’, *Anaerobe*. Elsevier Ltd, 23, pp. 12–19. doi: 10.1016/j.anaerobe.2013.07.009.
- Passamonti, S. *et al.* (2003) ‘The stomach as a site for anthocyanins absorption from food’, *FEBS Letters*, 544(1–3), pp. 210–213. doi: 10.1016/S0014-5793(03)00504-0.
- Petra, C. V., Rus, A. and Dumitraşcu, D. L. (2017) ‘Gastric microbiota: tracing the culprit.’, *Clujul medical (1957)*, 90(4), pp. 369–376. doi: 10.15386/cjmed-854.
- Phan, A. D. T. *et al.* (2015) ‘Binding of dietary polyphenols to cellulose: Structural and nutritional aspects’, *Food Chemistry*, 171, pp. 388–396. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.08.118.
- Piotrowska, H., Kucinska, M. and Murias, M. (2012) ‘Biological activity of piceatannol: Leaving the shadow of resveratrol’, *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*. Elsevier B.V., 750(1), pp. 60–82. doi: 10.1016/j.mrrev.2011.11.001.
- Rajilić-Stojanović, M. *et al.* (2013) ‘Long-term monitoring of the human intestinal microbiota composition’, *Environmental Microbiology*, 15(4), pp. 1146–1159. doi: 10.1111/1462-2920.12023.
- Ramos, J., David, E. S. and Waing, K. G. D. (2016) ‘Phytochemical screening and antibacterial testing of different varieties of *Morus* spp. (Mulberry)’, *Journal of Biological Engineering Research and Review*, 3(1), pp. 44–48.
- Rechner, A. R. *et al.* (2002) ‘The metabolic fate of dietary polyphenols in humans’, *Free Radical Biology and Medicine*, 33(2), pp. 220–235. doi: 10.1016/S0891-5849(02)00877-8.

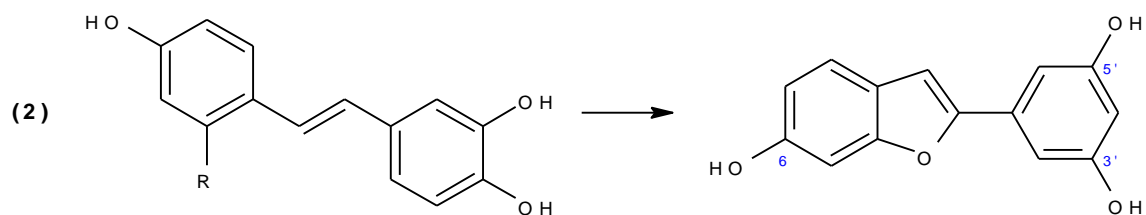
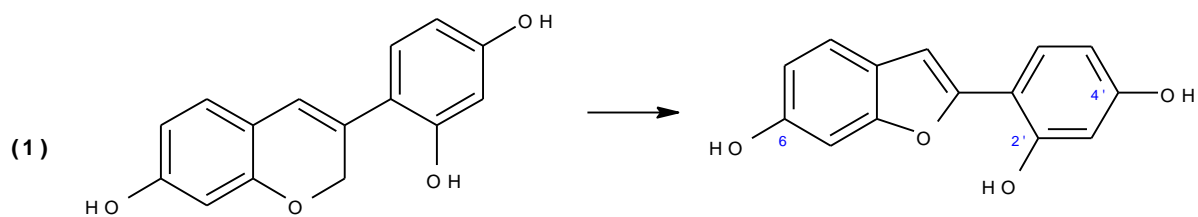
- Rechner, A. R. *et al.* (2004) 'Colonic metabolism of dietary polyphenols: Influence of structure on microbial fermentation products', *Free Radical Biology and Medicine*, 36(2), pp. 212–225. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2003.09.022.
- Von Reuß, S. H. and König, W. A. (2004) 'Corsifurans A-C, 2-arylbenzofurans of presumed stilbenoid origin from *Corsinia coriandrina* (Hepaticae)', *Phytochemistry*, 65(23), pp. 3113–3118. doi: 10.1016/j.phytochem.2004.10.002.
- Rivière, C., Pawlus, A. D. and Mérillon, J.-M. (2012) 'Natural stilbenoids: distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in Vitaceae', *Natural Product Reports*, 29(11), p. 1317. doi: 10.1039/c2np20049j.
- Scalbert, A. *et al.* (2002) 'Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health.', *Biomedecine & Pharmacotherapy*, 56, pp. 276–282.
- Seo, J., Keum, Y. and Li, Q. X. (2009) 'Bacterial Degradation of Aromatic Compounds', *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6(1), pp. 278–309. doi: 10.3390/ijerph6010278.
- Singh, R. *et al.* (2013) 'Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of *Morus alba* Linn.: A review', *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(9), pp. 461–469. doi: 10.5897/JMPR012.1079.
- Slanina, J. and Táborská, E. (2004) 'Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka', 245.
- Sohn, H. Y. *et al.* (2004) 'Antimicrobial and cytotoxic activity of 18 prenylated flavonoids isolated from medicinal plants: *Morus alba* L., *Morus mongolica* Schneider, *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent, *Sophora flavescens* Ait and *Echinosophora koreensis* Nakai', *Phytomedicine*, 11(7–8), pp. 666–672. doi: 10.1016/j.phymed.2003.09.005.
- Stalikas, C. D. (2007) 'Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids', *Journal of Separation Science*, pp. 3268–3295. doi: 10.1002/jssc.200700261.
- Stapleton, P. D. *et al.* (2007) 'The beta-lactam-resistance modifier (-)-epicatechin gallate alters the architecture of the cell wall of *Staphylococcus aureus*', *Microbiology*, 153(7), pp. 2093–2103. doi: 10.1099/mic.0.2007/007807-0.
- Stevens, J. F. and Maier, C. S. (2016) 'The chemistry of gut microbial metabolism of polyphenols', *Phytochemistry Reviews*, pp. 425–444. doi: 10.1007/s11101-016-9459-z.

- Stevens, J. F. and Page, J. E. (2004) 'Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: To your good health!', *Phytochemistry*, pp. 1317–1330. doi: 10.1016/j.phytochem.2004.04.025.
- Stocking, E. M. and Williams, R. M. (2003) 'Chemistry and biology of biosynthetic Diels-Alder reactions', *Angewandte Chemie - International Edition*, 42(27), pp. 3078–3115. doi: 10.1002/anie.200200534.
- Švestka, T. (2007) 'Mikroflóra trávicího traktu a probiotika', *Interní medicína*, 9(9), pp. 389–391.
- Tarko, T., Duda-Chodak, a and Tuszynski, T. (2009) 'Simulation of Phenolic Compounds Transformations and Interactions in an in Vitro Model of the Human Alimentary Tract', *Food Science and Technology International*, 9862(4), p. 1082013209339861-. doi: 10.1177/1082013209339861.
- Thursby, E. and Juge, N. (2017) 'Introduction to the human gut microbiota', *Biochemical Journal*, 474(11), pp. 1823–1836. doi: 10.1042/BCJ20160510.
- Tzounis, X. *et al.* (2008) 'Flavanol monomer-induced changes to the human faecal microflora', *British Journal of Nutrition*, 99(4). doi: 10.1017/S0007114507853384.
- Venkatesh, K. R. and Seema, C. (2008) 'Mulberry : Life enhancer', *J. Med. Plants Res.*, 2(10), pp. 271–278.
- Verhoeckx, K. *et al.* (2015) 'The impact of food bioactives on health: In vitro and Ex Vivo models', *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models*, pp. 1–327. doi: 10.1007/978-3-319-16104-4.
- Vijayan, K., Srivastava, P. P. and Awasthi, A. K. (2004) 'Analysis of phylogenetic relationship among five mulberry (*Morus*) species using molecular markers', *Genome*, 47(3), pp. 439–448. doi: 10.1139/g03-147.

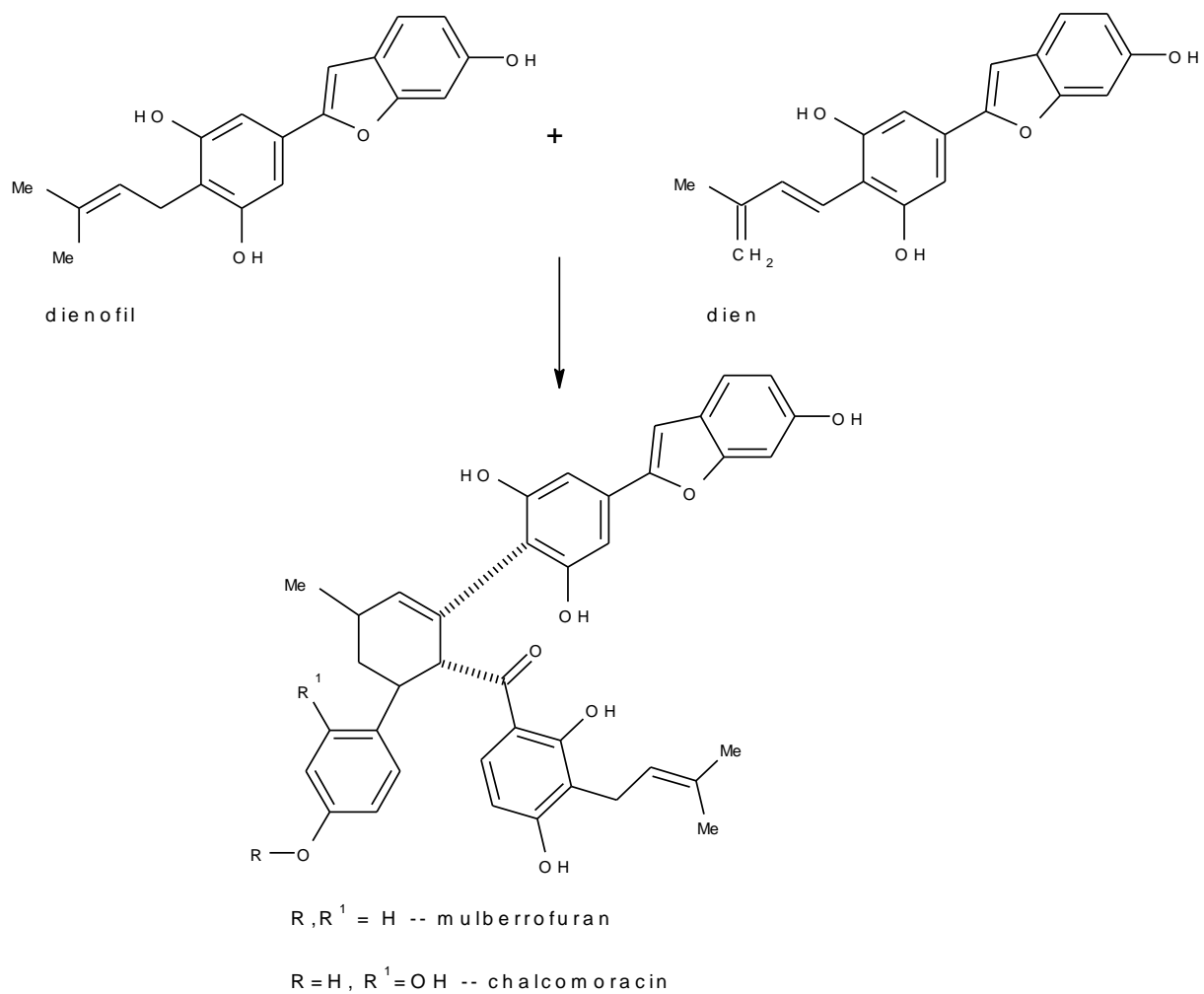
8 Přílohy



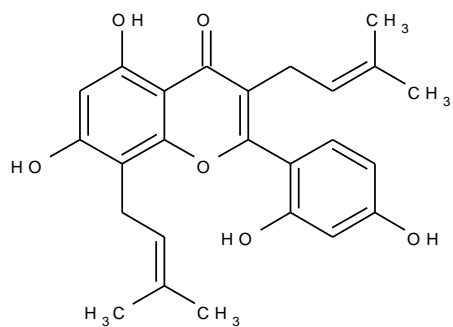
Obrázek 11: Vznik stilbenoidů.



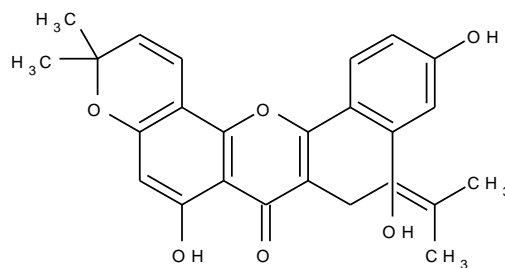
Obrázek 12: (1) Vznik 2-arylbenzofuranu z isoflavonoidu; (2) vznik 2-arylbenzofuranu (moracin M) ze stilbenoidu.



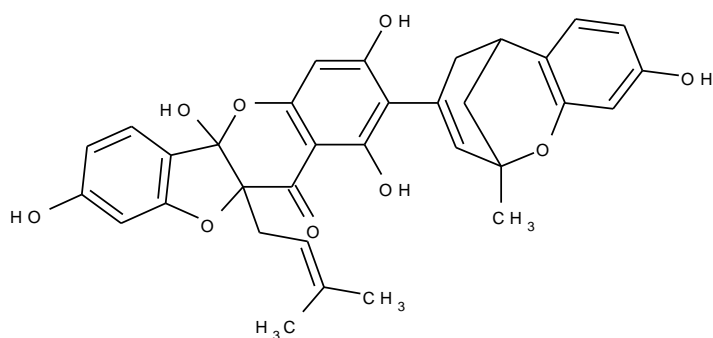
Obrázek 13: Vznik 2-arylbenzofuranů Diels-Alderovou reakcí.



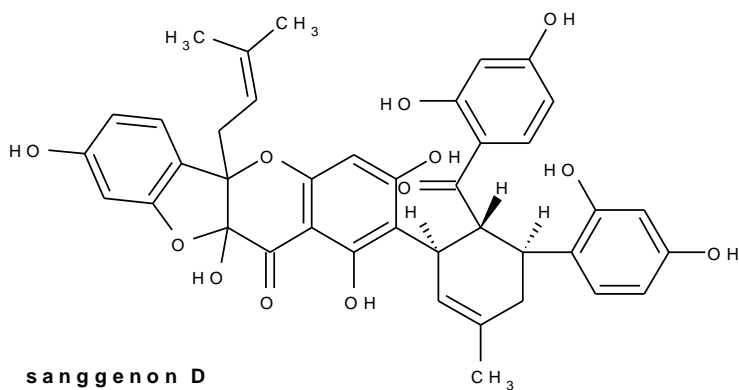
kuwanon C



morusin

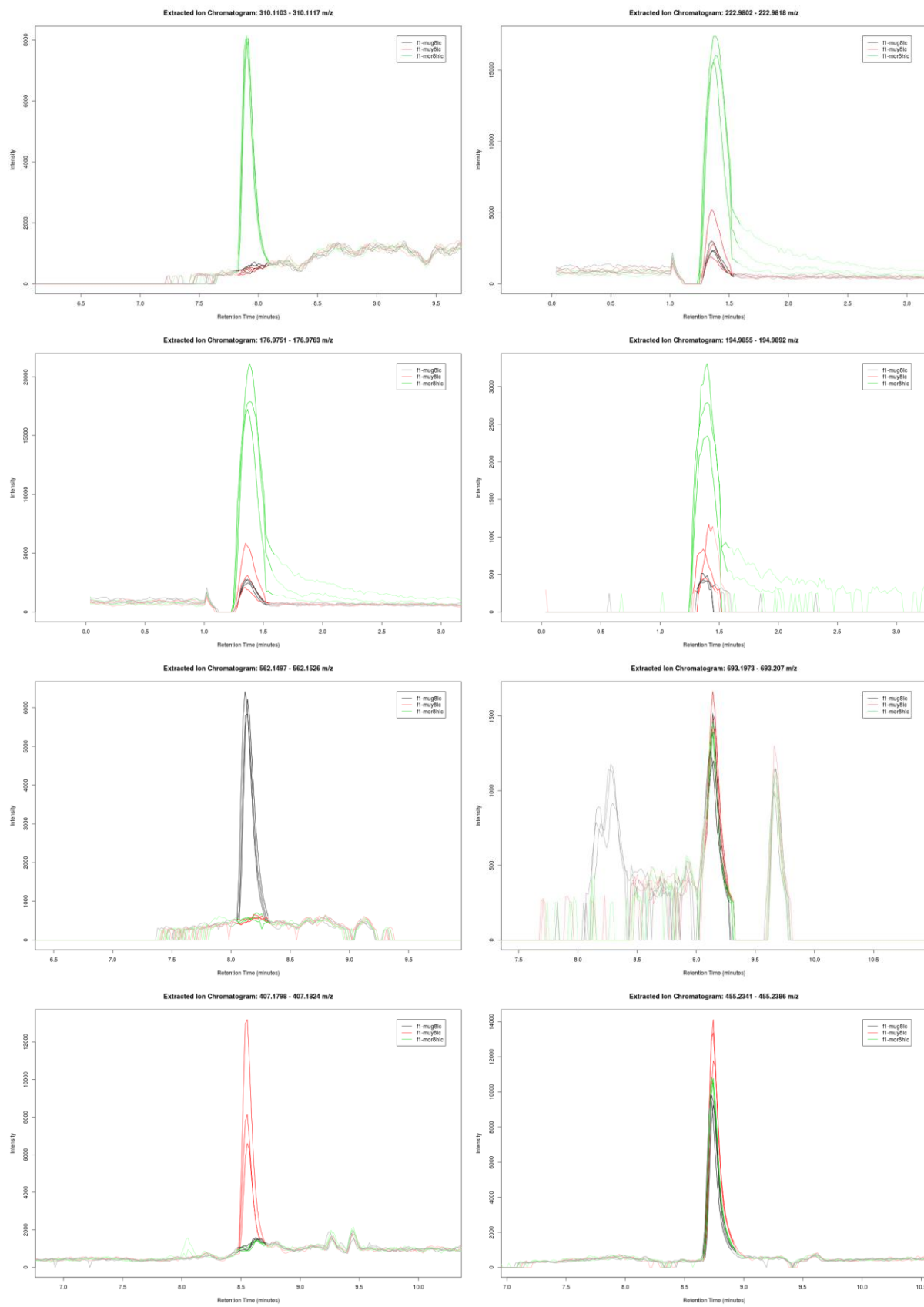


sanggenon B



sanggenon D

Obrázek 14: Další významné látky příbuzné 2-arylbenzofuranům vyskytující se v moruši.



Obrázek 15: Výstup z programu XCMS zobrazující nalezené testované látky a jejich potenciální metabolity.