

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA



**STUDIE EXTRAKTŮ PLODŮ *LONICERA*
CAERULEA L. A *VACCINIUM*
MACROCARPON AIT. PRO JEJICH
VYUŽITÍ V DOPLŇCÍCH STRAVY**

DISERTAČNÍ PRÁCE

OLOMOUC 2011

JAN HEINRICH

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA



Jan Heinrich

**STUDIE EXTRAKTŮ PLODŮ *LONICERA*
CAERULEA L. A *VACCINIUM*
MACROCARPON AIT. PRO JEJICH
VYUŽITÍ V DOPLŇCÍCH STRAVY**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Školitel: prof. MUDr. RNDr. Vilém Šimánek, DrSc.

Obor: Lékařská chemie a biochemie

Disertační práce byla vypracována během kombinované formy doktorského studia na Ústavu lékařské chemie a biochemie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci v období září 2006 – srpen 2011.

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury, kterou cituji. Spoluautoři souhlasí s použitím publikovaných výsledků.

V Olomouci dne 19.10.2011

.....

Mgr. Jan Heinrich

Disertační práce byla vypracována v rámci řešení projektů MŠM 6198959216 a FT-TA3/024 a tímto děkuji firmě Walmark, a.s. za poskytnutou podporu při financování projektu.

Děkuji všem pracovníkům Ústavu lékařské chemie a biochemie LF UP za vytvoření tvůrčího a příjemného pracovního prostředí a pomoc při řešení odborných problémů. Zvláště děkuji svému školiteli, prof. MUDr. RNDr. Vilimu Šimánkovi, DrSc., za odborné vedení, cenné připomínky, rady a předané zkušenosti během mého doktorského studia a ing. Kateřině Valentové, Ph.D. za významnou pomoc ve výzkumné části a za rady, připomínky a důkladné korektury při sepisování odborných textů a disertační práce. Ing. Ireně Palíkové, Ph.D. děkuji za spolupráci, zejména při analýzách obsahových látek, důkladné zaškolení a rady při mnoha experimentálních činnostech.

Ing. Janu Vackovi, Ph.D., Mgr. Martině Zatloukalové a Mgr. Pavlu Kosinovi, Ph.D. (Ústav lékařské chemie a biochemie, LF UP, Olomouc) děkuji za rady a spolupráci při analýzách obsahových látek.

Prof. ing. Vladimíru Křenovi, DrSc. a ing. Petru Marholovi, Ph.D. (Mikrobiologický ústav AV, Praha) děkuji za vlídné přijetí, zaškolení a rady při přípravě extraktů v Mikrobiologickém ústavu AV a za spolupráci při analýzách obsahových látek.

Dále děkuji doc. RNDr. Petru Bednářovi, Ph.D. a jeho kolektivu (Katedra analytické chemie, PFF UP, Olomouc) za spolupráci při analýzách obsahových látek v rámci stabilitních studií a panu Miroslavu Chovancovi (Zahradnictví Chovanec, Lipník nad Bečvou) za poskytnutý rostlinný materiál. Děkuji i doc. MUDr. Ivaně Oborné, Ph.D. (Porodnicko-gynekologická klinika, LF UP, Olomouc) za poskytnutí biologického materiálu pro izolaci lidských endotelových buněk.

Prof. RNDr. Jitce Ulrichové, CSc., přednostce Ústavu lékařské chemie a biochemie, LF UP, děkuji za cenné rady a připomínky předané v průběhu celého mého působení na jejím pracovišti.

Ing. Richardu Reichenbachovi a PharmDr. Janě Tisančinové, Ph.D. (Walmark, Trinec) děkuji za podnětné připomínky a rady, Mgr. Bogdanu Mruzkovi za spolupráci při vývoji testovaných tablet a dále svým nadřízeným, ing. Martině Šimové a MUDr. Pavlu Kábrtovi za umožnění skloubit běžné pracovní povinnosti s prací na projektu. Děkuji také ing. Davidu Görögovi, ing. Jitce Řehůrkové a paní Ireně Pavelkové za spolupráci při stabilitních studiích.

V neposlední řadě bych chtěl poděkovat své manželce a dětem za pochopení, trpělivost a podporu při studiu a rodičům za pomoc nejen finanční.

SOUHRN

V této předkládané disertační práci jsou výsledky studií s intaktními plody *Lonicera caerulea* L. a *Vaccinium macrocarpon* Ait. a jejich extrakty, které jsou využitelné pro výzkum nových doplňků stravy.

Plody zimolezu modrého (*L. caerulea* L.) jsou významné především obsahem anthokyaninů. V Evropě byla této rostlině dosud věnována jen malá pozornost. Klikva velkoplodá (*V. macrocarpon* Ait.) je cenná zejména množstvím proanthokyanidinů. V tradiční medicíně se plody *V. macrocarpon* Ait. využívají při opakovaných infekcích dolních cest močových.

Z plodů *L. caerulea* L. byly připraveny ethanolové extrakty a fenolová frakce pro kvalitativní analýzu anthokyaninů. Extrakty připravené za laboratorních podmínek (extrakt L) a simulací průmyslové extrakce (extrakt P) byly následně srovnávány za účelem ověření, zda případný transfer do průmyslových podmínek nemá negativní vliv na vlastnosti extraktu. V obou extraktech byla stanovena koncentrace anthokyaninů, fenolových kyselin a dalších látek. Byly provedeny testy zhasnutí DPPH radikálu, stanovení redukční kapacity Folin-Ciocalteauovým činidlem a na buněčných kulturách lidských endotelových buněk byly extrakty testovány na cytotoxicitu. Nebyly nalezeny žádné statisticky významné rozdíly mezi extrakty L a P jak analýzou aktivních látek, tak při testech na subbuněčné a buněčné úrovni.

Lyofilizované plody *L. caerulea* L. a extrakty *V. macrocarpon* Ait. byly využity jako aktivní suroviny při výrobě tablet, které byly následně použity v různých obalech ve stabilitních studiích pro testování fyzikálních, chemických a mikrobiologických atributů. Vzhledem k hygroskopickým vlastnostem lyofilizovaných plodů *L. caerulea* L. musely být stabilitní studie tablet *Lonicera* předčasně ukončeny. Jako nejvhodnější obal pro zvýšení stability těchto tablet se jeví PVC blistr s hliníkovou folií. Přípravky s obsahem extraktů *V. macrocarpon* Ait. vyhovovaly ve všech časových bodech všem sledovaným parametrům. Přípravek s obsahem extraktu Hi-PAC (extrakt *V. macrocarpon* Ait. standardizovaný na proanthokyanidiny) nevykazoval během stabilitní studie žádné změny v redukční kapacitě měřené Folin-Ciocalteauovým činidlem, nicméně docházelo k postupnému snižování obsahu všech sledovaných proanthokyanidinů. Obsah některých sledovaných polymerů proanthokyanidinů s časem stoupl.

S čerstvými plody *L. caerulea* L. byla provedena intervenční studie. Cílem bylo zjistit, zda sedmidenní konzumace plodů může ovlivnit markery oxidačního stresu v krvi

a dále detekce metabolitů. Deset zdravých dobrovolníků, nekuřáků, konzumovalo 165 g čerstvých plodů (ekvivalent 208 mg/den anthokyaninů)/den. V krevních vzorcích byly analyzovány základní biochemické parametry a parametry oxidačního stresu a byla provedena standardní analýza moči. Koncentrace flavonolů, anthokyaninů, fenolových a jiných kyselin, jak volných, tak konjugovaných, byla stanovena v plodech a v plasmě/moči metodou HPLC/DAD-ESI-MS.

Celková antioxidační kapacita plazmy nebyla intervencí ovlivněna. Došlo ke zvýšení hladin glutathionperoxidasy, katalasy a látek reagujících s thiobarbiturovou kyselinou (TBARS) v erythrocytech a naopak ke snížení TBARS v plazmě. Byly zaznamenány pozitivní, ale statisticky nevýznamné změny, ve snížení hladin produktů pokročilé oxidace proteinů a produktů oxidovaného LDL. Nejvíce zastoupeným metabolitem byla hippurová kyselina, jejíž hladina volné frakce se z 199 238 µg/mg kreatininu zvýšila na 476 937 µg/mg. Největší relativní nárůst byl zaznamenán u protokatechové kyseliny. Během studie nebyly zaznamenány nežádoucí účinky a nebyly ovlivněny žádné biochemické a hematologické parametry.

Plody *L. caerulea* L. a *V. macrocarpon* Ait. jsou využitelné jako suroviny ve formě intaktních plodů, extraktů či frakcí v doplňcích stravy. Jejich biologická aktivita, potvrzená v dřívějších studiích, z nich činí vhodné funkční potraviny, které příznivě ovlivňují zdraví lidí. Pro využití v doplňcích stravy je nutné optimalizovat metodu zpracování plodů a volbu vhodných obalů či lékových forem pro udržení stability.

Klíčová slova: *Lonicera caerulea*, *Vaccinium macrocarpon*, fenolové látky, anthokyaniny, stabilitní studie, lidské endotelové buňky, bezpečnost, antioxidační status, hippurová kyselina, dihydroxybenzoová kyselina.

SUMMARY

This thesis describes the results of studies on the intact fruit of *Lonicera caerulea* L. (blue honeysuckle) and *Vaccinium macrocarpon* Ait. (cranberry) and their extracts.

The fruit of the blue honeysuckle are particularly important for their anthocyanin content. This plant has received little attention in Europe. Cranberry is especially valuable along to its large amount of proanthocyanidins. In traditional medicine, the fruit of *V. macrocarpon* are used for repeated infections of the lower urinary tract.

The fruits of *L. caerulea* L. were prepared as ethanol extracts and phenolic fractions for the qualitative analysis of anthocyanins. The extract prepared under laboratory conditions (extract L) was compared with extract prepared by simulated industrial extraction (extract P) in order to test whether the eventual transfer to industrial conditions affects the extract properties. For both extracts, the concentration of anthocyanins, phenolic acids and other substances were determined. Tests were carried out by the quenching DPPH radicals method and by determination of Folin-Ciocalteu reducing capacity. The human endothelial cell cultures were used for testing of cytotoxicity. No statistically significant differences between extracts L and P from analysis of active substances, antioxidant tests and tests on cellular level were found.

The lyophilized fruits of *L. caerulea* and extracts of *V. macrocarpon* were used as active ingredients in the preparation of tablets, which were then used in various packages in stability studies for testing physical, chemical and microbiological properties. Due to the hygroscopic properties of the freeze-dried fruits of *L. caerulea*, the stability studies on the tablets were aborted prematurely. The most suitable package for increasing the stability of these tablets appears to be PVC blister with aluminum foil. Preparations containing extracts of *V. macrocarpon* suit at all time points in all monitored parameters. The product containing Hi-PAC (powdered cranberry juice standardized for proanthocyanidins) showed no change in Folin-Ciocalteu reducing capacity. However, there was a significant reduction in all identified proanthocyanidins. The content of some polymers of monitored proanthocyanidins increased over time.

A pilot intervention study was carried out on *L. caerulea* fresh berries. The aim was to determine whether a 7-day fruit consumption would affect oxidative stress markers in blood and to study the urine metabolites. Ten healthy, non-smoking volunteers consumed 165 g/day fresh berries (208 mg/day anthocyanins) for one week. Basic biochemical and

hematological parameters and markers of oxidative stress were determined in all blood samples, and standard urinalysis was performed. The content of phenolic acids, flavonols and anthocyanins was determined in berries and urine by HPLC/DAD-ESI-MS.

The total antioxidative capacity in plasma was unaffected by the intervention. Increase in glutathione peroxidase and catalase activities and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) level was found in erythrocytes, but TBARS level in plasma were decreased. There were reported positive, but statistically non significant changes in the reduction of advanced oxidation protein products (AOPP) and oxidized LDL. In urine, the most abundant metabolite was hippuric acid. The highest relative increase was noted for protocatechuic acid. No adverse effects of the intervention were reported. No biochemical, hematological parameters were changed and blood pressure was unaffected.

The fruits of *L. caerulea* and *V. macrocarpon*. can be used as raw material in the form of intact fruits, extracts or fractions in food supplements. Their biological activity, confirmed in earlier studies, makes them suitable functional foods with positive impact on human health. For use in food supplements, it is necessary to optimize methods for processing fruits, selection of appropriate packaging and dosage forms for maintaining stability.

Keywords: *Lonicera caerulea*, *Vaccinium macrocarpon*, polyphenolic compounds, anthocyanins, stability studies, human endothelial cells, safety, antioxidant status, hippuric acid, phenolic acids

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Přehled současného stavu problematiky	2
2.1	Nomenklatura	2
2.1.1	Makronutrienty, mikronutrienty a nutraceutika	2
2.2	Současný stav trhu s doplňky stravy a legislativní vymezení.....	3
2.2.1	Zdravotní a výživová tvrzení	3
2.2.2	Dosavadní hodnocení zdravotních tvrzení EFSA	5
2.3	Jedlé plody s vysokým obsahem anthokyaninů.....	8
2.3.1	Fenolové kyseliny	10
2.3.2	Anthokyaniny.....	12
2.3.3	Plody <i>Lonicera caerulea</i>	13
2.4	Biologická aktivita anthokyaninů a fenolových kyselin.....	17
2.4.1	Role anthokyaninů v protizánětlivé aktivitě	18
2.4.2	Farmakokinetika anthokyaninů a fenolových kyselin	19
2.4.3	Metabolismus anthokyaninů	23
2.4.4	Dosavadní výzkum biologické aktivity <i>L. caerulea</i> L.	25
3	Cíle disertační práce.....	28
4	Experimentální část.....	29
4.1	Biologický materiál	29
4.1.1	Rostlinný materiál	29
4.1.2	Lidský biologický materiál	29
4.2	Chemikálie, roztoky a přístroje.....	29
4.2.1	Chemikálie	29
4.2.2	Roztoky	30
4.2.3	Přístroje	32
4.2.4	Ostatní materiál	33
4.3	Statistické hodnocení	33
4.4	Příprava extraktů a frakcí.....	34
4.4.1	Příprava ethanolových extraktů	34
4.4.2	Příprava fenolové frakce	34

4.4.3	Extrakce plodů <i>L. caerulea</i> L. za dvou různých podmínek	34
4.5	Zhodnocení vlastností extraktů	35
4.5.1	Stanovení fenolových kyselin	35
4.5.2	Stanovení anthokyaninů	36
4.5.3	Stanovení redukční kapacity	37
4.5.4	Stanovení zhášení DPPH radikálu	37
4.5.5	Stanovení cytotoxicity na buněčných modelech	37
4.6	Stabilitní studie	39
4.6.1	Názvy, popis a složení testovaných přípravků	40
4.6.2	Použití šarže, obaly, podmínky a délka stabilitních studií	41
4.6.3	Frekvence testování	41
4.6.4	Atributy, postupy a kritéria přijatelnosti testování	42
4.6.5	Stanovení redukční kapacity	43
4.6.6	Stanovení obsahu proanthokyanidinů	43
4.7	Intervenční studie	45
4.7.1	Design studie	45
4.7.2	Stanovení parametrů oxidačního stresu	45
4.7.3	LC/MS stanovení anthokyaninů, fenolových kyselin	50
4.7.4	Příprava vzorků moči pro HPLC analýzu a enzymatické štěpení	50
5	Výsledky	54
5.1	Výsledky zpracování extraktů a frakcí a jejich hodnocení	54
5.1.1	Výtěžky ethanolových extrakcí a přípravy fenolové frakce	54
5.1.2	HPTLC stanovení anthokyaninů	54
5.1.3	Srovnání extraktů s různými podmínkami extrakce	55
5.2	Stabilitní studie	60
5.2.1	Výsledky fyzikálně-chemických a mikrobiologických atributů	60
5.2.2	Výsledky stanovení redukční kapacity	68
5.2.3	Výsledky stanovení prokyanidinů	70
5.3	Výsledky intervenční studie	73
5.3.1	Studie obsahových látek a metabolitů v plazmě a moči	75
6	Diskuse	78
6.1	Příprava a hodnocení extraktů	78
6.2	Stabilitní studie	79

OBSAH

6.3	Intervenční studie.....	80
7	Závěry	83
8	Seznam prací vztahujících se k disertaci.....	85
8.1	Publikace.....	85
8.2	Příspěvky na konferencích.....	85
9	Ostatní práce	87
9.1	Publikace.....	87
9.2	Příspěvky na konferencích.....	87
10	Literatura	88

Seznam zkratek

ALT	alaninaminotransferasa
AOPP	produkty pokročilé oxidace proteinů
AST	aspartátaminotrasferasa
Caco-2	buněčná linie odvozená od adenokarcinomu střeva
CDNB	1-chloro-2,4-dinitrobenzen
C _{max}	maximální plazmatická koncentrace
CRP	C-reaktivní protein
CYP	cytochrom P450
ČL	Český lékopis
DAD	detektor s diodovým polem
DM	sušina
DMSO	dimethylsulfoxid
DPPH	1,1-difenyl-2-pikrylhydrazil
DTNB	5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoová) kyselina
EBS	Earleův roztok
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
eNOS	endotelová syntasa oxidu dusnatého
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin (European Food Safety Authority)
ERK	extracelulárním signálem regulovaná proteinkinasa
FDA	Úřad USA pro správu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)
GAE	ekvivalent galové kyseliny
GGT	gama-glutamyltransferasa
GIT	trávicí ústrojí
GPx	glutathion peroxidasa
GSH	glutathion
GSHred	glutathion reduktasa
GSSG	oxidovaný glutathion
GST	glutathion transferasa

SEZNAM ZKRATEK

HDL	lipoproteiny o vysoké hustotě
HL-60	buněčná linie odvozená z lidských leukemických buněk
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPTLC	vysokoúčinná chromatografie na tenké vrstvě
HUVEC	lidské endotelové buňky z pupeční žíly
IFN	interferon
IL	interleukin
JNK	c-Jun N-terminální kinasa
Kf.	Karl Fischerova titrace
LC	kapalinová chromatografie
LDH	laktátdehydrogenasa
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě
MAPK	mitogenem aktivované proteinkinasy
MS	hmotnostní spektrometrie
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenylnitrazolium bromid
NADH	redukovaný nikotinamidadenin dinukleotid
NADPH	redukovaný nikotinamidadenin dinukleotid fosfát
NBT	2,2'-di-p-nitrofenyl-5,5'-difenyl-3,3'-[3,3'-dimethoxy-4,4'-difenylen]ditetrazolium chlorid (nitrotetrazoliová modř)
PA	proanthokyanidiny
PBS	fyzilogický roztok upravený na pH 7,4
PF	fenolová frakce
Ph.Eur.	Evropský lékopis
PMS	fenazin methosulfát
PDGF	růstový faktor z destiček
PGE2	prostaglandin E2
ROS	volné kyslíkové radikály
RV	relativní vlhkost
SD	směrodatný odchylka
SDS	dodecylsulfát sodný
SPE	extrakce tuhou fází

SOD	superoxiddismutasa
SS	stabilitní studie
TAC	celková antioxidační kapacita
TBA	thiobarbiturová kyselina
TBARS	látky reagující s thiobarbiturovou kyselinou
<i>t</i> BH	<i>tert</i> -butylhydroperoxid
TCA	trichloroctová kyselina
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
$T_{\max}$	čas od podání látky do dosažení maximální plazmatické koncentrace
TNF- α	tumor nekrotizující faktor- α
Tris	tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	ultrafialové záření
VEGF	růstový faktor cévního endotelu
VIS	viditelná oblast spektra
VLDL	lipoproteiny o velmi nízké hustotě
XOD	xanthinoxidasa
ZT	zdravotní tvrzení

1 Úvod

Dvacáté století přineslo jeden zcela nový fenomén. Zájem obyvatelstva o zdravotní stav vedl k hlubšímu studiu účinků denní diety na lidský organismus ve zdraví i nemoci. Vědecké poznatky vlivu složení diety na prevenci a snížení rizika některých chronických nemocí iniciovaly rozvoj a výrobu přípravků, které jsou označovány jako doplňky stravy (dříve potraviny pro zvláštní výživu). Doplňky stravy jsou přípravky obsahující vitaminy, minerální látky včetně stopových prvků, extrakty/intaktní části rostlinného či živočišného původu anebo čisté látky izolované z potravy (nutraceutika) s příznivým vlivem na zdraví. Doplňky stravy jsou vyráběny ve formě tablet, tobolek a tekutých forem. Vedle doplňků stravy jsou na trhu také obohacené a funkční potraviny.

Lékařský výzkum na přelomu druhého a třetího tisíciletí přinesl nové objevy o vlivu některých látek v potravě na fyziologické funkce organismu na molekulární úrovni. Tyto poznatky spolu se stále sofistikovanějšími marketingovými nástroji přispěly k nebyvalému rozvoji výroby doplňků stravy a funkčních potravin.

Pracuji již přes deset let ve farmaceutické společnosti Walmark, která je zaměřena na výrobu doplňků stravy. Během své práce jsem mohl ze znalosti konkurenčního prostředí sledovat, jaký je vyvíjen tlak na vysoké zisky za cenu opomíjení některých odborných informací či naopak účelové manipulace s těmito daty. Touto předkládanou prací bych chtěl přispět k tomu, co by mělo být především v zájmu výrobců, a to vyrábět takové doplňky stravy, které mají příznivý vliv na zdraví jejich uživatelů.

2 Přehled současného stavu problematiky

2.1 Nomenklatura

2.1.1 Makronutrienty, mikronutrienty a nutraceutika

Medicína založená na důkazech klade důraz na vyváženou a pestrou výživu a zdravý životní styl jako prevenci před vznikem chronických onemocnění [2]. Potravina je složena z makronutrientů a mikronutrientů [3]. Makronutrienty jsou bílkoviny, peptidy, sacharidy, tuky a nukleové kyseliny. Mezi mikronutrienty se řadí vitaminy, minerální látky, stopové prvky a další nízkomolekulární sloučeniny, zejména sekundární metabolity rostlin, např. polyfenoly. Nutraceutikum (neboli funkční ingredience) je pak obecně jakákoliv složka, případně celá potravina, která ovlivňuje některé fyziologické funkce v těle a má prokazatelně příznivý, ne však terapeutický účinek na lidský organismus [4]. Zvláštní skupinou nutraceutik jsou fytoceutika, chemické látky izolované z rostlin, např. flavonol kvercetin [5]. Funkční potravina je pak taková, která obsahuje určitou minimální koncentraci alespoň jednoho nutraceutika [6-8].

Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2002/46/ES definuje doplňky stravy jako „potraviny, jejichž účelem je doplňovat běžnou stravu a které jsou koncentrovanými zdroji živin nebo jiných látek s výživovým nebo fyziologickým účinkem, samostatně nebo v kombinaci, jsou uváděny na trh ve formě dávek, a to ve formě tobolek, pastilek, tablet, pilulek a v jiných podobných formách, dále ve formě sypké, jako kapalina v ampulích, v lahvičkách s kapátkem a v jiných podobných formách kapalných nebo sypkých výrobků určených k příjmu v malých odměřených množstvích“ [9].

Doplňky stravy mohou obsahovat následující aktivní složky:

- Funkční potravinu (např. jako intaktní části rostlin upravené pouze sušením, rozemletím, lyofilizací)
- Komplexní extrakt funkční potraviny (např. extrakt zeleného čaje, rybí olej)
- Frakce komplexního extraktu funkční potraviny (např. anthokyaniny z barevného ovoce)
- Čisté nutraceutikum (chemicky jednotné látky, např. glukosamin hydrochlorid, resveratrol, vitaminy a biogenní prvky)
- Kombinace výše uvedených surovin

U všech věkových skupin populace lze složením stravy s optimální denní dávkou nutraceutik předcházet mnohým chronickým onemocněním nebo snížit riziko jejich vzniku. Klasickými příklady jsou ovlivnění hladiny cholesterolu a glukózy v krvi, snížení rizikových faktorů vzniku kardiovaskulárních onemocnění, zmírnění průběhu osteoartrózy, vzniku chronického zánětu střevní sliznice a dalších.

2.2 Současný stav trhu s doplňky stravy a legislativní vymezení

Zvýšený zájem o zdravou výživu vyvolal potřebu produkce potravin, které zlepšují některé negativní aspekty denní diety, např. snížení energetické hodnoty stravy, omezení cukrů nebo některých minerálů. Současně vyvolal potřebu obohacování potravin o některé zdravé prospěšné substance, např. omega-3 polynenasycené mastné kyseliny, fytosteroly, β -oligofruktany a další. Tento protikladný pohled na výživu měl za následek vývoj nových produktů na poli potravinářského průmyslu: funkčních potravin. Termín funkční potravina není oficiálně definován. Evropský projekt FUFOS (Functional Food Science in Europe) [10] předložil pracovní definici: Potravina může být považována za funkční, pokud má prokazatelný příznivý vliv na jednu nebo více fyziologických funkcí v těle, bez ohledu na její výživovou hodnotu. Japonsko bylo prvním státem, ve kterém byla na potravinách uváděna zdravotní tvrzení (např. „Vitamin A pomáhá udržovat správné vidění v temnu“), následovaly USA a státy Evropská Unie [11].

2.2.1 Zdravotní a výživová tvrzení

Mezi odborníky, spotřebiteli, příslušnými úřady a potravinářským/farmaceutickým průmyslem převládá v posledních letech konsenzus, že na výrobku uváděný příznivý biologický účinek pro jakoukoliv potravinu by měl být vědecky prokázáný (opodstatněný) [11]. V roce 2005 byla iniciována institucemi EU potřeba stanovení kritérií pro vědecky opodstatněné účinky potravin, tzv. zdravotní tvrzení. Tato iniciativa byla koordinována projektem PASSCLAIM (Process for the Assessment of Scientific Support for Claims on Foods) [12]. Kritéria PASSCLAIM zahrnují: (1) charakterizaci potravin nebo substance, (2) údaje z klinických zkoušek na lidech, (3) využití markerů klinické biochemie pro statistické vyhodnocení významných změn fyziologického stavu, (4) požadavek na souhrnná data z více zdrojů a jejich statistické vyhodnocení před vlastním rozhodnutím, zda je zdravotní tvrzení (ZT) opodstatněné či nikoliv.

V prosinci roku 2006 bylo v EU přijato nařízení 1924/2006 EC, týkající se výživových a zdravotních tvrzení na potravinách [13]. Cílem tohoto nařízení je sjednotit

národní pravidla členských zemí na výživová a zdravotní tvrzení tak, aby si spotřebitel mohl svobodně vybrat mezi jednotlivými produkty na základě srozumitelných znalostí faktů, a zároveň zajistit spravedlivé konkurenční prostředí. Důležitým aspektem nařízení je, že veškerá výživová a zdravotní tvrzení musí být založena na obecně uznávaných vědeckých poznatcích a jejich prostřednictvím zdůvodněna (odst. 6, článek 6, Nařízení 1924/2006).

Nařízení 1924/2006 rozlišuje tvrzení na výživová a zdravotní. Výživové tvrzení je podle odst. 4 článku 2, citováno: takové, které uvádí, naznačuje nebo ze kterého vyplývá, že potravinu má určité prospěšné výživové vlastnosti. To může být v důsledku energetické hodnoty, kterou poskytuje jako takovou nebo poskytuje ve zvýšené či snížené míře nebo neposkytuje vůbec. Dále se může jednat o obsah živin či jiných látek, které analogicky obsahuje nebo obsahuje ve zvýšené či snížené míře nebo neobsahuje vůbec, např. „se sníženým obsahem soli“ nebo „zdroj vlákniny“.

Zdravotní tvrzení (ZT) je podle odst. 5 a 6, článku 2, citováno: takové, které uvádí, naznačuje nebo ze kterého vyplývá, že spotřeba určité kategorie potravin, potraviny nebo některé z jejích složek má vliv na zdraví nebo významně snižuje riziko vzniku určitého lidského onemocnění, např. „vitamin C příznivě ovlivňuje tvorbu kolagenu a tím přispívá ke zdraví kloubní chrupavky“.

Země mimo Evropskou Unii mají vlastní legislativní pravidla. V USA se na obalech potravin a doplňků stravy rozlišují tvrzení o obsahu živin či jiných látek (obdobu výživového tvrzení v Evropské unii), dále tvrzení o ovlivnění struktury nebo funkce, např. „vápník se podílí na pevných kostech“, a ZT [14]. Dělení je podobné jako v případě Evropské Unie, ale postup schválení a užívání je odlišný. Např. v případě strukturních/funkčních tvrzení je za pravdivost či opodstatněnost zodpovědný výrobce a dané tvrzení se pouze notifikuje u FDA (Úřad USA pro správu potravin a léčiv - Food and Drug Administration). V Japonsku se mohou uvádět tvrzení na potravinách pro zvláštní zdravotní účely označené jako FOSHU [15], pokud splňují určitá kritéria, mezi něž patří schválení používaného tvrzení Ministerstvem zdravotnictví, práce a sociálních věcí [16]. Obdobná situace je v Číně s tím, že není povinnost doložit pro schválení ZT výsledky z klinické studie; dostačující jsou experimenty na laboratorních zvířatech [17]. Zatímco v USA, Japonsku a Číně mají poměrně liberální požadavky pro zdravotní tvrzení, v Evropské Unii je jejich používání podmíněno odborným opodstatněním [11]. Tento fakt je odborníky podporován, nicméně ve vědeckých kruzích byly publikovány názory, že systém schvalování ZT v Evropě by se měl více podobat systémům v USA a Japonsku [18,

19]. Již během řešení projektu PASSCLAIM bylo uváděno, že posuzování vědeckých poznatků v rámci schvalování ZT se přibližuje podmínkám kladeným na schválení nového léčiva [12].

Povolená výživová tvrzení jsou pouze taková, která jsou uvedena v příloze Nařízení 1924/2006. Pokud výrobce nebo členský stát má zájem používat jiná tvrzení, musí požádat Evropskou komisi o doplnění tohoto tvrzení do přílohy. Evropská komise, pokud uzná za nutné, dané tvrzení konzultuje s EFSA (Evropský úřad pro bezpečnost potravin).

Při schvalování ZT platí odlišná pravidla v případech, že se jedná o tvrzení podle článku 13 (ZT týkající se ovlivnění funkce) nebo o tvrzení podle článku 14 (týkající se snížení rizika onemocnění anebo tvrzení vztahující se ke zdraví a vývoji dětí). Pro ZT podle článku 13.1 bude Evropskou komisí zaveden pozitivní seznam. Pro zařazení na seznam měly možnost všechny členské státy zaslat návrhy ZT do konce ledna 2008. Na základě kladného hodnocení EFSA mohou tato tvrzení výrobci užívat bez dalšího schvalování.

Zatímco podle čl. 13.1 podávají návrhy tvrzení členské státy, je schvalování tvrzení podle článku 14 iniciováno samotnými výrobci. Pro posouzení tvrzení podle čl. 13.1 stačí k vědeckému opodstatnění doložení relevantní literatury. Žádosti o schválení tvrzení podle čl. 14 musí být doprovázeny vědeckou dokumentací a jsou schvalovány Evropskou komisí individuálně. Žadatel podává dokumentaci příslušnému národnímu úřadu, v případě České republiky je to Státní zdravotní ústav. Ten přepośle žádost s dokumentací na EFSA, který dodá k žádosti odborný posudek a pošle ke schválení na Evropskou komisi. Obdobným způsobem se postupuje u nových žádostí pro tvrzení podle článku 13, které dosud nebudou uvedeny v pozitivním seznamu (tzv. tvrzení podle článku 13.5).

2.2.2 Dosavadní hodnocení zdravotních tvrzení EFSA

Ze 44 000 podaných návrhů ZT podle čl. 13 od států EU bylo v roce 2008 do seznamu EFSA zahrnuto 4637. EFSA uvedl, že všechna ZT budou posuzována podle jednotných pravidel, která však nebyla uveřejněna. K datu 19. listopadu 2010 bylo posouzeno celkem 1745 ZT. Zbývající, vyjma ZT vztahujících se k rostlinám, byla vyhodnocena do června 2011. Podle článku 13.5 bylo vyhodnoceno 28 ZT [20]. K datu 28. července 2011 bylo posouzeno celkem 2758 ZT a 331 ZT bylo z hodnocení vyloučeno. Zbývajících 1548 ZT, vztahujících se k rostlinám, bylo postoupeno ke konzultaci s Evropskou komisí, aby se dohodl další postup zpracování [21].

V Tab. 1 jsou uvedeny příklady ZT vyhodnocených podle článku 13. Při hodnocení se nebraly v úvahu klinické studie na nemocných lidech. Např. výsledky studií

PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

terapeutického účinku glukosaminu u pacientů s osteoartrózou nemohou být vztaženy ke zdravé populaci. Rovněž nebyly brány v úvahu poznatky o používání některých rostlin v lidovém léčitelství, což je v kontrastu se schvalováním tradičních herbálních léčivých přípravků.

Tab. 1: Příklady ZT podle článku 13 Nařízení 1924/2006 zhodnocených EFSA [11]

Vztah potravin či nutraceutik a oblastí zdraví, které byly posouzeny pozitivně
Vápník a kosti
Fluoridy a zuby
Vitamin C a ochrana DNA, bílkovin a tuků před oxidativním poškozením
Hořčík a energie, dělení buněk
Biotin, niacin a energie
Selen nebo vitamin C a antioxidant
Žvýkačky bez cukru a zuby
Beta glukán a cholesterol
Vztah potravin či nutraceutik a oblastí zdraví, které byly posouzeny negativně
Některá probiotika a posílení imunitního systému
Kyselina gama-linolenová a redukce zánětu
Taurin a energie, výkonnost
Některé rostliny, které byly nedostatečně charakterizovány
Glukosamin a klouby
Žraločí chrupavka a klouby
Tripeptidy a normální krevní tlak

Z asi 260 podaných návrhů ZT podle článku 14 [11] bylo doposud zhodnoceno 76 [22].

Finální závěry hodnocení EFSA mohou být v následujících formátech:

- Vztah mezi konzumací potravin či nutraceutik a účinkem byl potvrzen (pozitivní posouzení).
- Ke stanovení vztahu mezi konzumací potravin či nutraceutik není doložena dostatečná vědecká dokumentace (negativní posouzení).
- Vztah mezi konzumací potravin či nutraceutik a účinkem nebyl potvrzen (negativní posouzení).

Příklady dosud zhodnocených ZT s pozitivním nebo negativním posouzením podle článku 14 vztahující se ke zdraví a vývoji dětí a vztahující se ke snížení rizika onemocnění jsou uvedeny v tabulkách (Tab. 2, resp. Tab. 3).

Tab. 2: Příklady ZT zhodnocené EFSA podle článku 14 Nařízení 1924/2006, vztahující se ke zdraví a vývoji dětí (<http://www.efsa.europa.eu/en/ndaclaims/ndaclaims14.htm>)

ZT posouzená pozitivně
Kyselina alfa-linolenová a kyselina linolová jsou potřebné pro normální růst a vývoj dětí
Bílkoviny, fosfor, vitamin D, vápník a kombinace vitaminu D a vápníku jsou potřebné pro normální růst a vývoj kostí u dětí
DHA podporuje normální vývoj mozku a očí, ale pouze v případě plodu, kojených dětí a malých dětí do 2 let věku
Železo podporuje kognitivní vývoj dětí a adolescentů
Thiamin je potřebný pro normální metabolismus sacharidů a energetický výdej u dětí
Kinder čokoláda® pomáhá v růstu dětí a mladých dospělých ve věku 4-21 let
ZT posouzená negativně
Kyselina dokosahexaenová a eikosapentaenová má uklidňující účinky, podporuje mentální vývoj a schopnost učit se, podporuje pozornost a myšlení
Mléčné výrobky (mléko a sýry) mohou podporovat správnou tělesnou hmotnost a pomáhají podporovat zdraví zubů u dětí

Tab. 3: Příklady ZT zhodnocené EFSA podle článku 14 Nařízení 1924/2006, vztahující se ke snížení rizika onemocnění (<http://www.efsa.europa.eu/en/ndaclaims/ndaclaims14.htm>)

ZT posouzená pozitivně
Ovesný beta-glukan snižuje hladinu cholesterolu
Žvýkání žvýkaček bez cukru snižuje demineralizaci zubů a vede k nižší incidenci zubního kazu
Minimálně 1200 mg vápníku (a 800 I.U. vitaminu D) ze všech zdrojů může vést k redukci rizika zlomenin kostí (platí pouze u žen starších 50 let)
ZT posouzená negativně
Glukosamin hydrochlorid snižuje míru degradace kloubní chrupavky a snižuje riziko vzniku osteoartrózy
Brusinkový džus a sušené brusinky pomáhají redukovat riziko infekcí močových cest u žen inhibicí adheze určitých bakterií na stěny močových cest
Uroval (Valosun) – extrakt z brusinek a D-manosa snižuje riziko vzniku infekcí močových cest
Fermentovaný mléčný nápoj Actimel obsahující <i>Lactobacillus casei</i> (Lc) DN-114 001 redukuje výskyt toxinů <i>Clostridium difficile</i> ve střevě, a tím snižuje incidenci akutního průjmu

2.3 Jedlé plody s vysokým obsahem anthokyaninů

Ovoce představuje jeden z nejdůležitějších zdrojů fenolových sloučenin jako zdraví prospěšných fytochemikálií (fytoceutik). Významné místo mezi těmito fytoceutiky zaujímají anthokyaniny, které tvoří důležitou skupinu ve vodě rozpustných pigmentů, poskytujících rostlinným pletivům modrou, fialovou a červenou barvu. Barevné vlastnosti jsou dány mj. spojováním do komplexů s vyšší absorbcí světelných vln a vytvářením komplexů s kovy [23]. Anthokyaniny se vyskytují zejména v bobulovitém ovoci s výrazným tmavým zbarvením. Bobule (*bacca*) patří mezi cenokarpní nepukavé plody, které mají celé oplodí dužnaté [24]. Mezi bobule se laicky často řadí, především díky anglickému termínu „berry“, plody rodu ostružiník (*Rubus spp.*), ačkoliv se jedná o agregované plody. Nicméně mnoho plodů rodu ostružiník obsahuje rovněž vysoké množství anthokyanů, proto jsou i tyto rostliny zařazeny v textu.

Tab. 4: Vyobrazení nejběžnějších rostlin s plody s vysokým obsahem anthokyaninů



Ribes nigrum (rybíz černý, blackcurrant), *Grossulariaceae* (meruzalkovité) [25]



Aronia melanocarpa (temnoplodec, chokeberry), *Rosaceae* (růžovité) [26]



Solanum melongena (lilek vejcoplodý, baklažán, eggplant), *Solanaceae* (lilkovité) [27]



Rubus occidentalis (ostružiník ojiněný, black raspberry), *Rosaceae* (růžovité) [28]



Rubus ursinus × *idaeus* („malinoostružiny“, boysenberry), *Rosaceae* (růžovité) [29]



Rubus fruticosus (ostružiník křovitý, common blackberry), *Rosaceae* (růžovité) [30]



Rubus caesius (ostružiník ježiník, o. sivý, European dewberry), *Rosaceae* (růžovité) [31]



Rubus idaeus (ostružiník maliník, raspberry), *Rosaceae* (růžovité) [32]



Vaccinium uliginosum (brusnice vlochyně, bog bilberry), *Ericaceae* (vřesovcovité) [33]



Vaccinium myrtillus (brusnice borůvka, bilberry), *Ericaceae* (vřesovcovité) [34]



Vaccinium corymbosum (brusnice chocholičnatá, „kanadská borůvka“, northern highbush blueberry), *Ericaceae* (vřesovcovité) [35]



Vitis vinifera (réva vinná, grape), *Vitaceae* (révovité) [36]



Ribes rubrum (rybíz červený, redcurrant), *Grossulariaceae* (meruzalkovité) [37]



Sambucus nigra (bez černý, elderberry), *Adoxaceae* (pižmovkovité) [38]



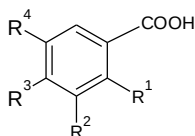
Amelanchier ovalis (muchovník vejčitý, serviceberry), *Rosaceae* (růžovité) [39]

Obsah fytochemikálií v bobulovitém ovoci je závislý na stupni zralosti, genotypových odlišnostech, klimatických podmínkách před sklizní, skladovacích podmínkách po sklizni a metodách zpracování sklizeného ovoce [40]. Fenolové látky jsou nezbytné pro metabolismus rostlin a jsou produkovány jako reakce na poškození vnějšími činiteli. Ve vysokých koncentracích mohou fenolové sloučeniny nebo jejich oxidační produkty reagovat s proteiny, sacharidy a minerály [41]. Na tomto místě je vhodné před dalším

textem zmínit otázku týkající se terminologie. Dle nejnovější definice by termín „polyfenol“ měl být používán výhradně pro „rostlinné sekundární metabolity produkované šikimátovou fenylypropanoidovou a/nebo polyketidovou metabolickou drahou, obsahující více než jedno aromatické jádro substituované hydroxylovými skupinami a neobsahující ve své základní struktuře dusíkaté funkční skupiny“. Tato definice nezahrnuje monofenolové struktury, zejména fenolové kyseliny, které jsou biogenetickými prekurzory, ale také metabolity polyfenolů, a jejichž studium je se studiem polyfenolů nerozlučně spjato [42].

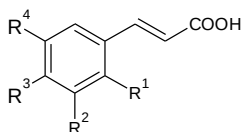
2.3.1 Fenolové kyseliny

Fenolové kyseliny (Obr. 1 a Obr. 2) tvoří zhruba třetinu celkového dietního příjmu fenolových látek. V rostlinných materiálech jsou obsaženy ve volné nebo vázané formě a jedná se o všudypřítomné sekundární metabolity. Jednoduché fenolové kyseliny jsou také produktem štěpení flavonoidů střevní mikroflorou [43]. Syntéza v rostlinách probíhá v reakcích přes kyselinu šikimovou z monosacharidů odvozených z glykolýzy a pentosového cyklu (Obr. 3), následně dochází cestou přes p-kumaroyl CoA (fenylpropanoidová cesta) ke tvorbě flavonoidů, včetně anthokyaninů [1, 44] (Obr. 5).



Obr. 1: Deriváty kyseliny hydroxybenzoové

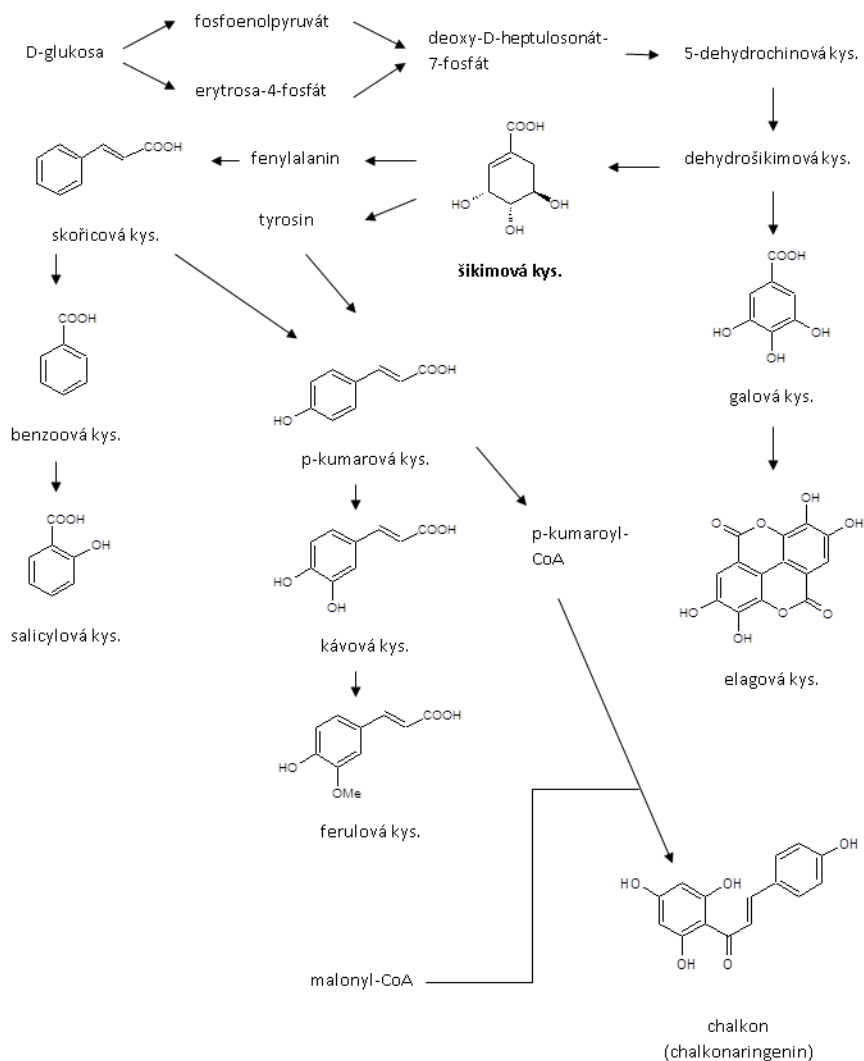
	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
gentisová	-OH	-H	-H	-OH
gallová	-H	-OH	-OH	-OH
o-pyrokatechová -	OH	-OH	-H	-H
protokatechová	-H	-OH	-OH	-H
salicylová	-OH	-H	-H	-H
vanilová	-H	-OCH ₃	-OH	-H



Obr. 2: Deriváty kyseliny hydroxyskořicové

	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
kávová	-H	-OH	-OH	-H
m-kumarová	-H	-OH	-H	-H
p-kumarová	-H	-H	-OH	-H
ferulová	-H	OCH ₃	-OH	-H

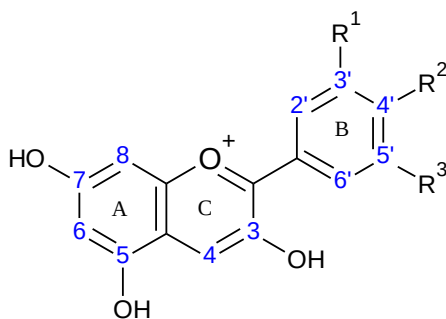
PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY



Obr. 3: Biosyntéza fenolových kyselin a chalkonů (upraveno podle Mandal et al., 2010 [1])

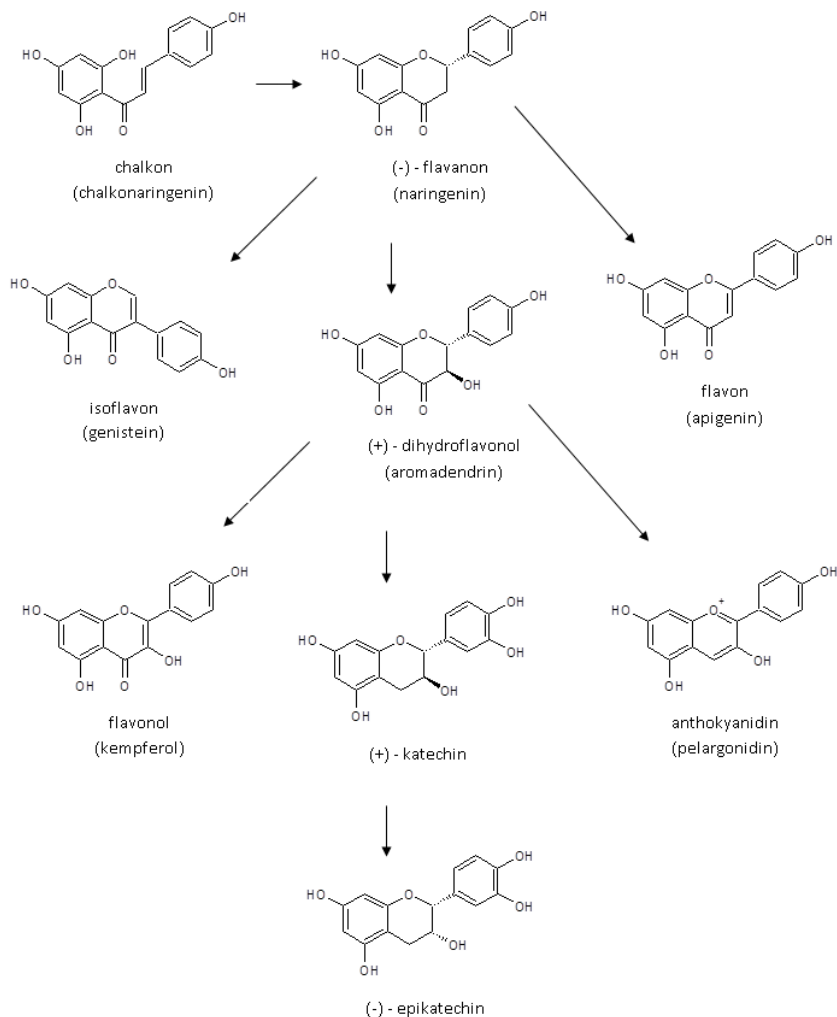
2.3.2 Anthokyaniny

Anthokyaniny (nazývané též anthokyaniny) patří mezi flavonoidy, což jsou polyfenoly, v jejichž struktuře je základním skeletem 2-fenyl-1,4-benzopyron. Rozdíly mezi flavonoidy jsou dány množstvím a pořadím hydroxylových skupin, rozsahem alkylace a glykosylace. Stupeň hydroxylace je určující pro jejich degradaci ve střevě a typ produktů vytvářených střevní mikroflórou [23]. Anthokyaniny se běžně vyskytují glykosylovány; aglykony (anthokyanidiny; Obr. 4) se nacházejí v čerstvých rostlinných materiálech jen zřídka [45]. Vyskytují se jako 3-glykosidy a 3,5-diglykosidy vázané s glukosou, rhamnosou, galaktosou nebo arabinosou [46].



Obr. 4: Strukturální vzorce anthokyanidinů

	R ¹	R ²	R ³
kyanidin	-OH	-OH	-H
delfinidin	-OH	-OH	-OH
pelargonidin	-H	-OH	-H
peonidin	-OCH ₃	-OH	-H



Obr. 5: Biosyntesa flavonoidů (upraveno podle Mandal et al., 2010 [1] a Hofta et al., 2004 [47])

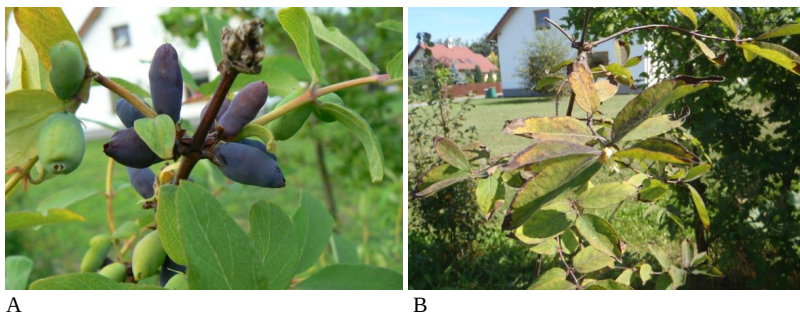
2.3.3 Plody *Lonicera caerulea*

Rod *Lonicera* (zimolez) se řadí do čeledi *Caprifoliaceae* (zimolezovitě), do které dále patří např. rody *Sambucus* (bez), *Viburnum* (kalina, tušalaj) a *Linnaea* (zimozel – nejmilejší rostlina Carla Linného) [48]. Rod zimolez zahrnuje okolo 180 druhů opadavých nebo

stálezelených, keřovitých, popínavých nebo půdopokryvných dřevin, přirozeně se vyskytujících zejména na severní polokouli, nejjihněji je rozšířen v Mexiku, severní Africe, na Jávě a Filipínách [49].

Mnohé z druhů zimolezu jsou pěstovány jako okrasné keře a popínavé rostliny, zejména pro krásu svých květů a plodů. V současné době pouze jediný druh, *L. caerulea* L., je pěstován jako ovocný keř s chutnými, modře zbarvenými plody. Ostatní druhy zimolezu mají většinou nejedlé, někdy i mírně jedovaté plody, ve zralosti zbarvené žlutě, oranžově, červeně, modře až černě. Plody zimolezů dozrávají většinou na jaře a v létě a často slouží jako potrava ptákům [48].

Bobule *L. caerulea* L. jsou zvláště v oblastech Ruska, Číny a Japonska považovány za ideální zdravé ovoce [50]. Plody jsou jedlé tmavě modré bobule s protáhlým, nepravidelně válcovitým tvarem, často se slupkou pokrytou voskovým povlakem. Plody pěstovaných kultivarů mohou dorůstat délky více než 2 cm s hmotností pohybující se v rozmezí 1 - 2 g. Chuť plodů je rozdílná podle kultivaru od hořké (zvláště u brzy plodících rostlin), přes velmi kyselou až kysele neutrální po trpce-sladkou; semena jsou zanedbatelné velikosti. Keře rozkvétají brzy na jaře a zralé plody se objevují již během května jako vůbec první ovoce u nás, zhruba 2 týdny před dozráváním jahod. Jedna rostlina má výnos okolo 2-3 kg [51]. V zahradnictví Chovanec (Lipník n. Bečvou) byl vyšlechtěn kultivar Remont (Obr. 6). U této odrůdy dochází při dostatečné zálaze a zahnojení po sklizni k samovolnému remontování (plody podruhé dozrávají obvykle koncem července) [52].



A

B

Obr. 6: Keř *L. caerulea* L., kultivar Remont, v prvním roce výsadby (A – dozrávající plody v květnu; B – stejný keř s jedním květem v září)

Na trhu se prodávají zejména produkty ve formě džemů, džusů a vína. Oblíbené mezi spotřebiteli v Číně jsou také křupavé, nafouknuté polštářky či plátky, připravené ze směsi

brambor, kukuřičného škrobu a rýže s obsahem 30 % rozmělněných bobulí. Sušením takto připravené kaše v horkém vzduchu mohou vzniknout křupavé plátky, ale z hlediska zachování vitamínu C a přirozenější barvy je pak vhodnější výroba nafouknutých polštářků v procesu využívající mikrovlnné záření a vakuum [50, 53] (Obr. 7).



Obr. 7: Křupavé nafouknuté polštářky z brambor, kukuřice a rýže s obsahem plodů *L. caerulea* L., připravené procesem využívajícím mikrovlnné záření a vakuum [50].

Obsah fenolových kyselin v plodech zimolezu modrého byl srovnáván s dalšími plody rostlin ze severovýchodního Polska [54]. Jednalo se o plody zimolezu modrého (*L. caerulea* var. *kamtschatica* Sevast), borůvky (*Vaccinium myrtillus*), ostružiny (*Rubus plicatus*), černého rybízu (*Ribes nigrum*) a muchovníku (*Amelanchier ovalis*). Celkový obsah fenolových sloučenin se pohyboval v rozmezí od 9907 ± 470 u černého rybízu do více než 23000 mg (+)-ekvivalentů katechinu na kg sušiny (mg/kg DM – sušiny; „Dry Matter“) plodů muchovníku, borůvek a ostružin. Obsah fenolových látek u zimolezu byl menší (21279 ± 890), než bylo zjištěno v jiných studiích [55-57], což může být ovlivněno několika faktory, jako např. varietálními a regionálními rozdíly, stupněm zralosti [58], stejně jako analytickými postupy při extrakci a kvantifikaci. Celkový obsah fenolových kyselin se pohyboval v rozmezí $2845,8 \pm 141,0$ (plody muchovníku) do $5418,2 \pm 228,0$ mg/kg DM (plody zimolezu). Obsah jednotlivých fenolových kyselin, a to jak volných, tak vázaných v esterech a glykosidech je uveden v Tab. 5 [54].

Na našem pracovišti byla připravena fenolová frakce z *L. caerulea* L. var. *kamtschatica* (4 % z původní hmotnosti čerstvých plodů) obsahující 33,5 % fenolových sloučenin, zahrnujících fenolové kyseliny, flavonoidy a anthokyaniny (18,5 %) [59]. V této frakci jsme identifikovali kyselinu chlorogenovou v množství 0,42 % fenolové frakce, což odpovídá 168 mg/kg DM, dále kávovou (0,14 %) a ferulovou (0,10 %) a celkový obsah protokatechové, gentisové, rozmarýnové a vanilové kyseliny byl 0,08 % [59].

PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

Tab. 5: Obsah celkových fenolových kyselin, volných, uvolněných z esterů a glykosidů v plodech zimolezu modrého (mg/kg DM) [54]

Fenolová kyselina	celkový obsah	volné	estery	glykosidy
Deriváty kyseliny hydroxybenzoové				
gentisová	153,5	1,5	116,8	35,2
galová	44,3	0,1	43,8	0,4
o-pyrokatechová	28,6	-	22,5	6,1
protokatechová	144,4	2,3	105,2	36,9
salicylová	1234,9	9,0	824,8	401,1
vanilová	21,1	-	10,2	10,9
Deriváty kyseliny hydroxyskořicové				
kávová	598,2	22,4	536,6	39,2
m-kumarová	2014,5	6,4	1402,0	606,0
p-kumarová	987,1	23,5	631,7	331,9
3,4-dimethoxyskořicová	44,2	-	29,9	14,3
ferulová	36,9	20,7	13,1	3,1
hydroxykávová	51,9	-	-	46,5
Další fenolické kyseliny				
p-hydroxyfenyloctová	10,3	0,9	9,4	-
p-hydroxyfenylmléčná	48,3	0,5	29,2	18,6

Tab. 6 uvádí srovnání obsahu anthokyaninů v plodech *L. caerulea* L. publikovaných v různých studiích. Hlavním nekondenzovaným anthokyaninem je kyanidin-3-glukosid (60 - 88 %), následovaný kyanidin-3-rutinosidem (1 - 11 %) a kyanidin-3,5-diglukosidem (0 - 9,9 %) [59-61]. Spíše minoritní část anthokyaninů zastupují peonidin-3-glukosid (2,8 - 5,8 %), peonidin-3-rutinosid (0,5 - 1,3 %) a pelargonidin-3-glukosid (0,2 - 3,3 %) [59, 60]. Na našem pracovišti jsme nově objevili v zimolezu modrém poměrně významné množství peonidin-3,5-diglukosidu (8,1%) a dále delfinidin-3-glukosid (1,2%), delfinidin-3-rutinosid (2,0 %) a pelargonidin-3-rutinosid (3,3 %) [59].

Tab. 6: Anthokyaniny analyzované v zimolezu modrém (% celkového množství)

místo sběru, kultivary	Oregon, USA, 10 různých kultivarů [60]	oblast Bělehradu, Rusko, kultivar neznámý [61]	střední Morava, Česká Republika, var. <i>kamtschatica</i> [59]
anthokyanin			
kyanidin-3-glukosid	79-88	84,8	60,0
kyanidin-3-rutinosid	1-11	6,4	7,3
kyanidin-3,5-diglukosid	2,2-6,4	0	9,9

PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

místo sběru, kultivary	Oregon, USA, 10 různých kultivarů [60]	oblast Bělehradu, Rusko, kultivar neznámý [61]	střední Morava, Česká Republika, var. <i>kamtschatica</i> [59]
anthokyanin			
peonidin-3-glukosid	2,8-4,5	-	5,8
peonidin-3-rutinosid	0,3-1,3	-	0,5
peonidin-3,5-diglukosid	-	-	8,1
delfinidin-3-glukosid	-	-	1,2
delfinidin-3-rutinosid	-	-	2,0
pelargonidin-3-glukosid	0,2-1,0	-	3,3
pelargonidin -3-rutinosid	-	-	0,1
pelargonidin -3,5-diglukosid	-	-	0,6

2.4 Biologická aktivita anthokyaninů a fenolových kyselin

Vliv polyfenolů na lidský organismus je obvykle dáván do souvislosti se dvěma účinky: (i) inhibicí některých enzymů, např. xanthinoxidasy či aldosareduktasy a (ii) antioxidační aktivitou [62-66]. Polyfenoly chrání jak další složky potravy (karotenoidy, vitamin C apod.) před oxidací, tak buňky střevního epitelu a enzymy trávicího ústrojí před poškozením volnými radikály.

Anthokyaniny a proanthokyanidiny vykazují antibakteriální vlastnosti a schopnost inhibovat adhezi bakterií na stěnách močových cest [67]. Anthokyaniny mají také protizánětlivé a antimutagenní účinky (viz dále) a udržují propustnost cév. Schopnost regulovat propustnost (permeabilitu) kapilár byla základem jejich definice jako vitaminu P. Chrání před hepatitidou A a B a před hepatotoxicitou paracetamolu [68]. Extrakty bobulovitého ovoce bohaté na anthokyaniny jsou spojovány se zlepšením symptomů neurologických onemocnění ve stáří a zvýšením rezistence červených krvinek proti oxidačnímu stresu v podmínkách *in vitro* [69]. Jak anthokyaniny, tak fenolové kyseliny mají schopnost redukovat vznik produktů pokročilé glykace, a tím chránit organismus před chronickými nemocemi [70, 71].

Anthokyaniny mají díky přítomnosti hydroxylové skupiny v pozici 3 kruhu C velmi dobré antioxidační účinky a jsou schopny chelátovat kovové ionty (Fe, Cu). Antioxidační aktivita může být zvýšena acylací sacharidových zbytků aromatickými hydroxykyselinami [72]. Tyto sloučeniny mají vyšší antioxidační aktivitu než vitaminy C a E nebo β -karoten [73].

U anthokyaninů se předpokládají poměrně významné chemopreventivní vlastnosti [74]. Nedávná studie ukázala, že anthokyaniny jsou schopny v podmínkách *in vitro* spustit

apoptózu lidských leukemických buněk prostřednictvím mechanismu indukce oxidačního stresu [75], a byla hodnocena jejich potenciální role v léčbě nádorových onemocnění [76, 77]. Autoři studie vlivu anthokyaninů na střevní nádorové buňky předpokládají jejich duální roli. U buněk s nízkým bazálním metabolismem stejně jako u nádorových buněk s nízkou proliferační schopností a nízkou malignitou (např. buňky Caco-2) se anthokyaniny chovají jako zhášecí volných radikálů a chrání buňky proti oxidačnímu stresu. Na druhou stranu, u maligních buněk s vysoce aktivním metabolismem, vysokou mírou produkce volných kyslíkových radikálů (ROS) a rezistencí na léčiva (např. buňky LoVo/ADR) působí delfinidin a kyanidin prooxidačně jednak díky redukci schopnosti zhášet ROS a dále díky úbytku množství glutathionu. Později pravděpodobně nastupuje zvýšení koncentrace GSSG, průběžně naakumulovaného jako výsledek inhibice glutathionreduktasy [78].

2.4.1 Role anthokyaninů v protizánětlivé aktivitě

Zánět je normální fyziologický proces vznikající jako odpověď na poškození tkání, mikrobiální infekce a podráždění chemikáliemi. Zahrnuje rovněž systémy vrozené a získané imunity [79].

Akutní zánět je iniciován buňkami nespecifického imunitního systému, které uvolňují rozpustné signální molekuly, jako jsou lipidové mediátory, vasoaktivní peptidy a cytokiny. Tyto molekuly způsobují vasodilataci a zvyšují vaskulární permeabilitu. Chronický zánět je koordinován T-lymfocyty, které v místě zánětu produkují cytokiny, např. IFN- γ a IL7, které zvyšují baktericidní aktivitu fagocytů a prodlužují jejich zánětlivé funkce [80, 81]. Akutní zánět zpravidla po ukončení vlivu vyvolávajícího podnětu sám odezní, neboť cytokiny mají krátký eliminační poločas, rychle degradují [82], a navíc samy inhibují pozdější fáze zánětu [83]. Pokud se zánět dostane do chronického stadia, může sice vést k rychlé eliminaci infekce, avšak při porušené kontrole dochází k dlouhodobému stavu, který poškozuje tkáň [84].

Epidemiologické studie a experimenty na zvířatech prokázaly, že anthokyaniny mohou přispívat k chemopreventivní aktivitě u mnoha chronických zánětlivých onemocnění [85, 86]. Bobule bohaté na anthokyaniny vykazují široké spektrum biologických účinků, které mohou souviset s protizánětlivým působením [87]. Kyanidin ve studii na zvířatech vykázal schopnost snížení hladiny prostaglandinu E₂ (PGE₂) v tkáních tlapek a hladiny tumor nekrotizujícího faktoru α (TNF- α) v séru zvířat s indukovanou artritidou [88]. Poškození a apoptóza cévních endotelových buněk se často vyskytují v aterosenních plátech, což vede ke zhoršení patologického stavu při ateroskleróze.

Kyanidin inhibuje apoptózu indukovanou TNF- α , zvyšuje expresi endotelové syntetasy oxidu dusnatého (eNOS) a thioredoxinu, a tím zlepšuje funkce cévního endotelu [89]. Jak kyanidin, tak delphinidin, hlavní anthokyanidiny přítomné v bobulovitém ovoci, inhibují expresi růstového faktoru cévního endotelu (VEGF) indukovanou růstovým faktorem z destiček (PDGF). To je dáno mechanismem „down-regulace“ p38 mitogen aktivované proteinkinasy (MAPK) a c-Jun N-terminální kinasy (JNK) signálů v buňkách hladkého svalstva cév [90].

Delphinidin má rovněž ochranný účinek před kardiovaskulárními chorobami. Předpokládá se, že proliferace cévních endotelových buněk je důležitá v patogenezi aterosklerózy [91]. Podávání delphinidinu inhibuje proliferaci bovinních endotelových buněk indukovanou VEGF přes modulaci extracelulárním signálem regulované proteinkinasy (ERK) a dále vede k zastavení buněčného cyklu [92]. Také delphinidinem zvýšená exprese eNOS prostřednictvím MAPK pochodů vede k ochraně před apoptózou bovinních aortálních endotelových buněk [93]. Navíc bylo dokázáno, že delphinidin zabraňuje poškození lidských endotelových buněk z pupeční žíly (HUVEC) oxidovanými lipoproteiny o nízké hustotě (LDL) a reguluje signální dráhu apoptózy [94].

2.4.2 Farmakokinetika anthokyaninů a fenolových kyselin

Biologická aktivita účinných látek závisí na jejich koncentraci v místě cílového působení. Preventivní nebo léčebný účinek je dán farmakokinetickými vlastnostmi (vstřebávání, distribuce, metabolismus a vylučování). Klinická farmakokinetika mnoha fenolových látek již byla zdokumentována. Absorpce flavonoidů v trávicím traktu (GIT) je významně ovlivněna tím, že většina z nich se vyskytuje v glykosidové formě. Často opomíjeným faktem může být vazba sloučenin na vlákninu v původním zdroji, tyto látky nejsou extrahovatelné běžnými metodami, teprve střevní mikroflóra dokáže tyto vazby štěpit [95]. Metabolismus sloučenin je zahájen ihned po vstupu do těla, ale hlavním místem zpracování jsou jaterní enzymy cytochromy P450 (CYP) [96].

Výzkum biologické dostupnosti fenolových sloučenin v první fázi obvykle probíhá ve studiích na experimentálních zvířatech. Tab. 7 ukazuje, že některé fenolové sloučeniny jsou vstřebávány poměrně rychle, např. elagová kyselina, jiné nikoliv, např. chlorogenová kyselina [97]. Tento rozdíl je dán vstřebáváním elagové kyseliny v horní části trávicího traktu, v žaludku a tenkém střevě. Chlorogenová kyselina je ester kávové a chinové kyseliny a v lidském organismu nejsou přítomny žádné esterasey, které by byly schopny ji hydrolyzovat. Také v tenkém střevě potkanů je metabolizováno jen velmi malé množství

PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

chlorogenové kyseliny. Jediným místem, kde dochází k metabolismu této kyseliny, je střevní mikroflóra. To je také dáno tím, že fenolové kyseliny vázané ve stěnách rostlinných buněk nemohou být uvolňovány savčími endogenními enzymy, nýbrž vyžadují hydrolýzu enzymy střevní mikroflóry (esterasy a xylanasy). Galová kyselina je vstřebávána v žaludku potkanů ve volné formě. Obecně je možné říci, že vstřebávání a biologická dostupnost je ovlivněna strukturou fenolové sloučeniny (glykosylace, molekulová hmotnost a esterifikace) [97].

Tab. 7: Farmakokinetické vlastnosti fenolových sloučenin u zvířat (upraveno podle McGhie & Walton [97])

Zvíře	Látka	Zdroj	Dávka	C _{max}	T _{max} (h)	Vylučování močí	Cit.
potkan	galová k.	izolovaná	100 µmol/kg	0,71 µmol/l	1,0	-	[98]
potkan	elagová k.	granátové jablko	85,3 mg/kg	0,203 µg/ml	0,5	-	[99]
potkan	chlorogenová k.	izolovaná	88,6 mg/den	113,4 µmol/l	12	58,8%	[100]
králík	anthokyaniny	černý rybíz	117 mg/kg	780 ng/ml	0,5	0,035%	[101]
prase	anthokyaniny	ostružiny	74 mg/kg	0,103 µmol/l	1	0,088%	[102]
prase	anthokyaniny	černý rybíz	100 mg/kg	0,09 µg/ml	2-4		[103]

Wu et al. [102] aplikovali prasatům dávku 74 mg/kg kyanidin-3-glukosidu z ostružin a zaznamenali maximální plazmatickou koncentraci původní sloučeniny (0,103 µmol/l; T_{max}: 60 min), methylovaných metabolitů (<0,021 µmol/l; T_{max}: 15-120 min) a glukuronidovaných sloučenin (<0,07 µmol/l; T_{max}: 15-60 min). Glukuronidy a methylované anthokyaniny byly nalezeny jako hlavní metabolity, které se objevily v moči prasat, nicméně tato přeměna není tak častá jako u jiných flavonoidů. Tyto údaje jsou potvrzením, že anthokyaniny mohou být vstřebávány jak v původní, tak v modifikované podobě po enzymatické přeměně v organismu [96, 104].

Nejčastější přirozené vyskytující se formy anthokyaninů jsou 3-O-glykosid nebo 3,5-di-O-glykosid, u lidí donedávna považovány za nevstřebatelné. Díky této domněnce byly farmakokinetické studie na anthokyaniny u lidí opomíjeny [105]. Teprve vývoj a adaptace metody HPLC-MS pro měření anthokyaninů v plazmě potvrdil, že anthokyaniny jsou lidskému organismu biologicky dostupné [105, 106]. Rovněž se zjistilo, že jsou vstřebávány v původní glykosylované formě [105, 107]

PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

Na základě těchto výsledků byla v poslední době publikována řada studií prováděných na lidských subjektech, které sledovaly biologickou dostupnost anthokyaninů. Některé látky jsou vstřebávány ve velmi krátkém čase, jiné nikoliv. Rovněž mohou být vstřebávány se strukturní modifikací nebo bez ní [96, 108] (Tab. 8).

Tab. 8: Farmakokinetické vlastnosti anthokyaninů u lidí (upraveno podle McGhie & Walton [97])

Zdroj	Metoda detekce	Dávka anthokyaninů (mg)	C _{max}	T _{max} (h)	Vylučování močí (%)	Cit.
Temnoplodec (<i>Aronia melanocarpa</i>) extrakt (7,1 g)	MS	721	0,096 μmol/l	2,8	0,15 (24 h)	[109]
Červené víno (<i>Vitis vinifera</i>) (300 ml)	VIS	218	-	-	5,1 (12 h)	[110]
Červené víno (<i>Vitis vinifera</i>) (400 ml)	VIS	280	43 ng/ml	1,5	0,23 (7 h)	[111]
Šťáva z červené révy vinné (<i>Vitis vinifera</i>) (400 ml)	VIS	284	100 ng/ml	0,5	0,18 (7 h)	[111]
Bez černý (<i>Sambucus nigra</i>) extrakt (25 g)	VIS	1500	100 ng/ml	0,5	-	[106]
Bez černý (<i>Sambucus nigra</i>), sušená šťáva	VIS	180	35 ng/ml	1	-	[112]
Bez černý (<i>Sambucus nigra</i>), extrakt (11 g)	MS	1900	-	-	0,003-0,012 (6 h)	[113]
Bez černý (<i>Sambucus nigra</i>), extrakt (12 g)	MS	720	0,097 μmol/l	1,2	0,06 (24 h)	[107]
Bez černý (<i>Sambucus nigra</i>), extrakt (12 g)	MS	720	-	-	0,08 (4 h)	[114]
Černý rybíz (<i>Ribes nigrum</i>), extrakt	VIS	236	0,120 μmol/l	1,25-1,75	0,11 (8 h)	[115]
Černý rybíz (<i>Ribes nigrum</i>), šťáva (200 ml)	VIS	153	-	-	0,02-0,05 (5 h)	[116]
Černý rybíz (<i>Ribes nigrum</i>), šťáva	VIS	1239	53 ng/ml	0,75	0,07 (4 h)	[101]

PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

Černý rybíz (<i>Ribes nigrum</i>), šťáva	VIS	716	16 ng/ml	0,75	0,05 (4 h)	[101]
Černý rybíz (<i>Ribes nigrum</i>), šťáva	VIS	746	32 ng/ml	1,5	0,05 (4 h)	[101]
Černý rybíz (<i>Ribes nigrum</i>), extrakt (300 ml)	MS	189	-	-	0,06 (7 h)	[117]
Borůvky (<i>Vaccinium corymbosum</i>) (189 g)	MS	690	-	-	0,004 (6 h)	[114]
Borůvky (<i>Vaccinium corymbosum</i>), extrakt (300 ml)	MS	439	-	-	0,02	[117]
Borůvky (<i>Vaccinium corymbosum</i>), prášek (100 g)	VIS	1200	0,029 μ mol/l	4	-	[118]
Malinoostružiny (<i>Rubus loganbaccus</i> x <i>baileyanus</i> Britt.), extrakt (300 ml)	MS	345	-	-	0,03 (7 h)	[117]
Ostružiny (<i>Rubus fruticosus</i>) (200 g)	MS	431	-	-	0,16 (24 h)	[119]
Jahody (<i>Fragaria spp.</i>) (200 g)	MS	76	-	-	1,8 (24 h)	[120]

Anthokyaniny jsou poměrně velké molekuly, dobře rozpustné ve vodě. Navzdory tomuto faktu se ukázalo, že přecházejí přes cytoplasmatickou membránu a byly detekovány uvnitř buněk [121]. Všechny studie z posledních let, které se zabývaly vstřebáváním anthokyaninů, dospěly k závěru, že se na rozdíl od jiných flavonoidů vstřebávají intaktní glykosidy [97]. Účinnost takového transportu je malá a závisí na aglykonu a navázané sacharidové složce. Například malvidin-3-glukosid z borůvek (*Vaccinium corymbosum*) se u buněčné linie odvozené od lidského kolorektálního karcinomu Caco-2 vstřebává účinněji než delfinidin-3-glukosid. Obdobně glukosid totožného aglykonu se vstřebává lépe než galaktosid [122]. Považujeme-li vylučování močí za indikátor vstřebávání v trávicím traktu, kyanidin-3-glukosid a delfinidin-3-glukosid se vstřebává relativně s menší účinností oproti jiným anthokyanům [117]. V případě aglykonů byly hladiny delfinidinu a kyanidinu v plazmě potkanů vyšší než malvidinu [123].

Z dosud publikovaných studií vyplývá, že biologická dostupnost anthokyaninů se liší oproti jiným flavonoidům v některých důležitých aspektech. Především, míra vylučování močí z přijatého množství zpravidla není vyšší než 0,1%, což by znamenalo, že vstřebané množství anthokyaninů je velmi malé. Kay et al. [109] sledovali biologickou dostupnost

anthokyaninů temnoplodce (720 mg v přijaté dávce). Změřili míru vylučování moči na 0,15% z přijatého množství po 2,8 hodinách. Toto množství bylo mnohem větší než v jiných studiích, jako např. při měření malvidin-3-glukosidu ze šťávy plodů červené vinné révy kolektivem Bub et al. [124]. Po příjmu 117 mg v 500 ml šťávy z modrého vína byl tento anthokyanin u dobrovolníků nalezen v původní formě v plazmě (2,8 nM) a v moči (0,02% přijatého množství). Na druhou stranu dochází k velmi rychlému vstřebávání, studie prokázaly, že $T_{\max}$ v plasmě se dosahuje za 15-60 minut a vylučování je dokončeno během 6-8 hodin [97].

V žaludku dochází k poměrně rychlému vstřebávání anthokyaninů. Potvrdily to studie na potkanech, kdy se intaktní glykosidy anthokyaninů při podání extraktu vinné révy objevily během několika minut v mozku zvířete [125] a docházelo k rychlé exkreci žluči [126]. Anthokyaniny z plodů vinné révy se objevily v portální a systémové plazmě do 6 minut po naplnění žaludku potkanů extraktem [127].

Mezi pravděpodobné mechanismy vstřebávání v žaludku patří interakce anthokyaninů s bilitranslokasou [128]. Bilitranslokasa je přenašeč lokalizovaný v bazolaterální doméně plazmatické membrány jaterních buněk [129], a také v žaludečním epitelu [130]. Anthokyaniny jsou rovněž vstřebávány v tenkém střevě, kdy se *in situ* na střevě potkana ukázalo, že jsou vstřebávány a vylučovány do žluči [131]. Kyanidin-3-glukosid byl *in vitro* na myším modelu GIT dobře vstřebáván v jejunu a nepatrně ve dvanáctníku. V ileu a tlustém střevě nebyly anthokyaniny vstřebávány vůbec [132].

Řada studií potvrdila, že anthokyaniny jsou vstřebávány v žaludku [125, 126] a v tenkém střevě [126, 132-134]. Je ale pravděpodobné, že se anthokyaniny transformují na látky, které dosavadní analytické metody nejsou schopny detekovat [97].

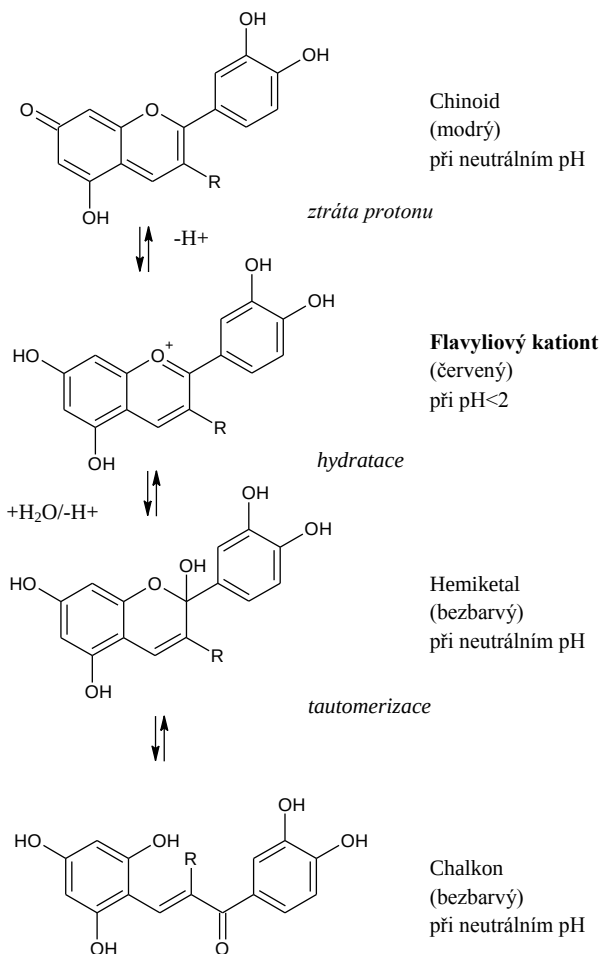
2.4.3 Metabolismus anthokyaninů

Anthokyaniny obsažené v potravinách se mohou vyskytovat ve velkém množství forem, jejichž chemická struktura souvisí s biosyntézou, akumulací v rostlinných pletivech, ale také následnými modifikacemi. Mnoho ovocných druhů obsahuje monoglykosidy, červená zelenina acylované anthokyaniny [97]. Byly objeveny také konjugáty anthokyanin-flavan-3-olu [135]. Tyto přirozeně se vyskytující anthokyaniny mohou být modifikovány ještě před konzumací, zvláště při zpracování a skladování potravin [97].

V gastrointestinálním traktu jsou anthokyaniny vystaveny různému prostředí s odlišným pH a různou mikrobiální flórou. Ve většině studií, které sledovaly biologickou dostupnost anthokyaninů, se prováděla detekce měření pomocí HPLC červeného

flavyliového kationtu. Tato forma se však *in vivo* téměř nevyskytuje. Pravděpodobná je hemiketalová a chalkonová forma, která se účastní vstřebávání a dalších metabolických reakcí [97]. Nízké pH v žaludku zaručuje, že anthokyaniny jsou udržovány ve stabilní formě flavyliového kationtu. Stabilita byla potvrzena studiemi za podmínek simulujících žaludeční prostředí [136, 137]. Při mnohem vyšším pH v tenkém a tlustém střevě jsou možnosti strukturních forem anthokyaninů rozmanitější, ale tyto formy jsou daleko méně stabilní [138] (Obr. 8). Navíc ve střevě působí mikrobiální flora, která modifikuje strukturu anthokyaninů. Ve studii používající mikrofloru prasete *in vitro* byly zjištěny podstatné přeměny anthokyaninů. Vystavení mikrofloře vede k rychlé deglykosylaci a demethylaci na příslušné aglykony. Tyto aglykony jsou při neutrálním pH velmi nestabilní a díky rozštěpení kruhu C rychle degradují na příslušné fenolové kyseliny a aldehydy [139]. Při inkubaci s lidskou střevní mikroflorou se dosáhlo podobných výsledků [140, 141]. Studie *in vitro* prokázaly, že anthokyaniny jsou ve velké míře přeměňovány střevními bakteriemi [140, 141]. Hlavní metabolit je protokatechová kyselina, následují 4-hydroxyskořicová, kávová, ferulová a 3-hydroxybenzoová kyselina [142]. Ve studii na potkaních byly naměřeny plasmatické koncentrace protokatechové kyseliny $8 \times$ vyšší než kyanidin-3-glukosidu [143]. Dosavadní studie tedy ukazují, že anthokyaniny, které se nevstřebají v žaludku, jsou v tlustém střevě přeměněny na fenolové kyseliny, které mohou být vstřebávány do vnitřního prostředí organismu.

Ve studiích na lidských subjektech bylo zjištěno, že anthokyaniny jsou v tenkém střevě poměrně stabilní. To bylo prokázáno u pacientů s ileostomií, kdy bylo v ileální tekutině obsaženo 40 [144] až 85 % přijatých anthokyaninů, v závislosti na sacharidové složce [145]. Na rozdíl od jiných flavonoidů, které jsou vstřebávány a vylučovány, většina anthokyaninů se nepřeměňuje na glukurono-, sulfo- nebo methylové deriváty [146].



Obr. 8: Různé formy anthokyaninů, které se tvoří v závislosti na pH prostředí [97]

2.4.4 Dosavadní výzkum biologické aktivity *L. caerulea* L.

Původem pochází *L. caerulea* L. z oblastí Ruska, Číny a Japonska, kde probíhá také nejobsáhlejší výzkum s cílem komerční produkce jejích plodů. Nespornými výhodami zimolezu modrého jsou nejen brzké období sklizně, příjemná chuť a vůně, ale i množství prospěšných účinků na lidské zdraví, především v oblasti působení na aterosklerosu,

hypertenzi, choroby gastrointestinálního traktu a bakteriální infekce. Biologická aktivita plodů *L. caerulea* L. je dána zejména vysokým obsahem vitamínu C a fenolových látek [147]. Extrakt z *L. caerulea* L. vykazuje výrazný protizánětlivý účinek proti uveitidě potkanů vyvolané endotoxinem. Možný mechanismus je nejspíše založen na jejich schopnosti inhibovat aktivaci jaderného faktoru κB (NF- κB) a následnou tvorbu prozánětlivých mediátorů TNF- α , PGE₂ a oxidu dusnatého [148].

Anthokyaniny bobulovitého ovoce chrání cévy udržováním jejich permeability, snižují intenzitu zánětlivé odpovědi a agregaci krevních destiček [149, 150]. Bioaktivní sloučeniny *L. caerulea* L. vykazují schopnost inhibice oxidace lipoproteinů. Studie na našem pracovišti prokázala snížení oxidačního poškození lidských lipoproteinů vyvolaného měďnatými ionty fenolovou frakcí *L. caerulea* L. var. *kamtschatica* v podmínkách *in vitro* [151]. Stejná fenolová frakce byla testovaná u potkaních hepatocytů a HUVEC. Fenolová frakce byla u obou buněčných linií netoxická v testovaných koncentracích 1-1000 $\mu g/ml$. Prokázala se inhibice peroxidace jaterních mikrosomů, vyvolaná modelovým toxinem *tert*-butylhydroperoxidem (tBH) a ochrana HUVEC před poškozením oxidativně modifikovanými LDL a také před poškozením tBH [152].

Na poli výzkumu rakoviny byla v roce 2000 v Japonsku provedena studie s extrakty ze 43 vzorků různých druhů bobulovitého ovoce. Byla zkoumána schopnost indukce diferenciacie leukemických buněk HL-60. Tento účinek může mít potenciálně terapeutický význam u leukémie a dalších typů rakoviny. Sledování indukce diferenciacie HL-60 bylo prováděno pomocí redukce nitrotetrazoliových solí (NBT). Extrakt ovoce *Actinidia polygama* vykazoval nejsilnější schopnost indukce diferenciacie HL-60 ($77,7 \pm 5\%$ buněk redukujících NBT). Účinek osmi vzorků *L. caerulea* L. var. *-Emphyllocalyx* Nakai závisel na zeměpisné oblasti růstu a mírnou schopnost indukce diferenciacie HL-60 vykazovaly všechny vzorky v poměrně širokém rozmezí (17,7 – 49,0 %). Byla zjištěna pozitivní korelace mezi schopností redukce NBT a koncentrací celkových fenolových sloučenin a také obsahem anthokyaninů, korelační koeficient byl mnohem větší v případě fenolových sloučenin ($r = 0,4292$) než u anthokyaninů ($r = 0,1352$) [153].

Kyanidin-3-glukosid, hlavní anthokyanin plodů *L. caerulea* L., chrání keratinocyty před poškozením UVA zářením, jak bylo ukázáno v podmínkách *in vitro* a *in vivo* [154]. Fenolová frakce připravená na našem pracovišti vykazovala ochranu před UVA zářením indukovanou produkcí ROS, což bylo také dokázáno sníženou lipoperoxidací a zvýšením koncentrace vnitrobuněčného redukovaného GSH u lidských keratinocytů HaCaT. Navíc

aplikace fenolové frakce na již ozářené buňky zmírila následky expozice záření UVA. Tato ochrana byla závislá na koncentraci s maximem 50 mg/l [155].

Sluneční UV záření, které dosáhne zemského povrchu, se z 90-99% skládá z UVA a 1-10% tvoří UVB záření. UVB je však genotoxičtější než UVA. Z toho důvodu byla provedena další studie vlivu frakcí *L. caerulea* L. a *Vaccinium myrtillus* L. na zmírnění poškození keratinocytů, způsobeného UVB zářením [156]. U obou frakcí se potvrdil ochranný účinek díky přímé eliminaci tvorby volných kyslíkových a dusíkových radikálů (RONS), redukce poškození DNA, snížení produkce IL-6 u ozářených buněk a dále ochrana před apoptózou ovlivněním aktivity kaspasy-3 a kaspasy-9 [156].

Pro stanovení vlivu extraktu *L. caerulea* L. na neoplazmatický transformační proces byla provedena studie na potkanech s implantovanými buňkami Walker 256. Chemopreventivní účinek byl sledován na skupině potkanů kmených extraktem tři týdny před implantací nádorových buněk ve srovnání s kontrolní skupinou a skupinou, u které byl počátek podávání extraktu ve stejné době jako implantace nádorových buněk. Objem nádoru byl překvapivě větší u skupiny, které byl podáván extrakt předem, oproti kontrolní skupině, nesoucí nádor bez suplementace. Podávání extraktu až při implantaci nádorových buněk vedlo rovněž k progresivnímu růstu nádoru, ale průměrný objem nádoru byl menší než u kontrolní skupiny [157].

3 Cíle disertační práce

Cílem disertační práce bylo zhodnotit dosavadní poznatky z přípravy extraktů *L. caerulea* L. a *V. macrocarpon* Ait. a možné převedení do průmyslových podmínek. V další části bylo cílem zhodnocení stabilit finálních tablet přípravků s obsahem extraktů jedlých plodů a studium vlivu konzumace plodů *L. caerulea* L. na markery oxidačního stresu u dobrovolníků, včetně studia metabolismu některých fenolových sloučenin.

Konkrétní cíle byly:

1. Příprava extraktů a frakcí *L. caerulea* L. a *V. macrocarpon* Ait. a zhodnocení vlastností extraktů *L. caerulea* L. připravených za „laboratorních“ a „průmyslových“ podmínek.
2. Provedení stabilitních testů tablet s obsahem extraktu *V. macrocarpon* Ait. a *L. caerulea* L.. Stabilita tablet byla hodnocena ve zrychlené a dlouhodobé stabilitní studii.
3. Intervenční studie s plody *L. caerulea* L. na dobrovolnících a vyhodnocení vlivu na parametry bezpečnostní laboratoře a oxidačního stresu.
4. Studie metabolitů v plazmě a moči.

4 Experimentální část

4.1 Biologický materiál

4.1.1 Rostlinný materiál

Pro nutriční analýzy, přípravu frakcí a extraktů byly použity mražené nebo lyofilizované plody *L. caerulea* L., odrůda „Modrý triumf“, poskytnuté Zahradnictvím Chovanec (Lipník nad Bečvou, Česká Republika) a lyofilizované plody *L. caerulea* L., původem z Číny, dodané firmou Walmark, a.s. (Třinec, Česká Republika).

Pro intervenční studii byla výše uvedená odrůda ze stejného zahradnictví sbírána ve dnech 20. května - 5. června 2010 a skladována při -20 °C.

Pro stabilitní studie byly použity tablety s extrakty výše uvedených plodů a dále komerční surovina Hi-PAC 4.0 (extrakt plodů *V. macrocarpon* Ait. standardizovaný na 4,75 % proanthokyanidinů), dodaná firmou Decas Botanical Synergies (USA).

4.1.2 Lidský biologický materiál

Vzorky pupečníků pro izolaci lidských endotelových buněk HUVEC byly získány z porodnicko-gynekologické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc. Odběr a zpracování tkání bylo prováděno s povolením Etické komise při Fakultní nemocnici Olomouc a Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci v souladu s českou legislativou a s informovaným souhlasem dárkyň. Pupečníky byly odebrány pouze po přirozených porodech od zdravých nekuřáček s fyziologickým těhotenstvím.

4.2 Chemikálie, roztoky a přístroje

4.2.1 Chemikálie

1,1-difenyl-2-pikrylhydrazil (DPPH), dimetylsulfoxid (DMSO), 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromid (MTT), disodná sůl ethylendiamintetraoctové kyseliny (Na_2EDTA), disodná sůl redukovaného β -nikotinamidadenindinukleotidu (NADH), 5,5'-dithio-bis(benzoová) kyselina (DTNB), dodecylsulfát sodný (SDS), ethidium bromid, ethylen-diamintetraoctová kyselina (EDTA), fenazin methosulfát (PMS), methanol (HPLC grade), neutrální červeň (NR), nitrotetrazoliová modř (NBT), penicilin (stabilizovaný roztok, 10000 U/ml) se

streptomycinem (10 mg/ml), Ponceau S, superoxiddismutasa (SOD, 3920 U/mg), *tert*-butylhydroperoxid (tBH), tetrasodná sůl redukovaného β -nikotinamidadeninukleotidu (NADPH), thiobarbiturová kyselina (TBA), tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), Triton X-100, 0,4% roztok trypanové modři, 0,25% roztok trypsin-EDTA, xanthin, xanthinoxidasa (XOD, 0,07 U/mg), 2,3-dihydroxybenzoová, 2-hydroxyfenyloctová, 2-hydroxyfenylpropanová, 3-(3-hydroxyfenyl)propionová, 3-(4-hydroxyfenyl)propionová, 3,4-dihydroxybenzoová, 3,4-dihydroxyfenyloctová, 3-hydroxybenzoová, 3-hydroxyfenyloctová, 4-hydroxyfenyloctová, dihydroferulová, dihydrokávová, elagová, fenyloctová, ferulová, galová, homovanilová, chlorogenová, kávová, protocatechová, rozmarýnová a sinapová kyselina, katechin hydrát, kyanidin, rutin hydrát a SYBR®Green byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (USA). (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); salicylová, skořicová, 4-hydroxybenzoová, hippurová, 3-hydroxyskořicová, gentisová, *p*-kumarová, syringová a vanilová kyselina, kvercetin, rutin a katechin (Sbírka přírodních sloučenin Ústavu lékařské chemie a biochemie, Lékařská fakulta Univerzity Palackého, Olomouc, Česká Republika); ferulová kyselina (Merck, Darmstadt, Německo); 4-hydroxyfenylpropanová (floreťová), isoferulová, 3-hydroxyfenylpropanová (Fluka, USA); benzoová kyselina (Lachema a.s., Brno, Česká Republika); a 2-hydroxyhippurová (Acros Organics, Geel, Belgie). Methanol a acetonitril byl zakoupen u firmy Merck, pufrovací roztoky a dalších chemikálie byly zakoupeny u Sigma-Aldrich;

Dále bylo použito Folin-Ciocalteuovo fenolové činidlo od firmy NYCOM (Česká republika). Ostatní chemikálie stupně čistoty p.a. byly zakoupeny od firmy Pliva-Lachema (Česká republika).

4.2.2 Roztoky

4.2.2.1 Zásobní roztok fosfátového pufru (PBS)

NaCl (0,137 mol/l), KCl (0,00268 mol/l), Na_2HPO_4 (0,00896 mol/l), KH_2PO_4 (0,00147 mol/l), pro experimenty byl zásobní roztok $10\times$ zředěn.

4.2.2.2 Roztoky a rozpouštědla, používaná pro extrakci vzorků a v kapalinové chromatografii

Voda, deionizovaná v aparatuře Ultrapur 10 super (Watrex, Česká republika), methanol ethanol p.a., 1% HCl v methanolu, 1% H_3PO_4 ve vodě, 1% HCl ve vodě, 50 mmol/l. fosfátový pufr KH_2PO_4 , pH 7.

4.2.2.3 Roztoky pro izolaci a kultivaci buněk HUVEC

Roztok želatiny na potahování kultivačních lahví a desek: 2% sterilní roztok hovězí želatiny (typ B) byl 10× ředěn sterilním PBS.

Earleův roztok (EBS): KCl (5,37 mmol/l), NaHCO₃ (26 mmol/l), NaCl (116 mmol/l), NaH₂PO₄·H₂O (1,02 mmol/l), glukosa (5,56 mmol/l).

Hanksův roztok bez Ca²⁺ a Mg²⁺: KCl (5,37 mmol/l), KH₂PO₄ (0,44 mmol/l), NaHCO₃ (4,2 mmol/l), NaCl (137 mmol/l), Na₂HPO₄ (0,34 mmol/l), glukosa (5,56 mmol/l).

Kultivační médium: bazální médium pro endotelové buňky obsahující aditiva a růstové faktory (Promocell).

Centrifugační médium: médium DMEM/F12, penicilin (100 U/l), streptomycin (100 mg/l), L-glutamin (2 mmol/l), FCS (20 %, v/v).

Stabilizační médium: médium DMEM/F12, penicilin (100 U/l), streptomycin (100 mg/l), L-glutamin (2 mmol/l), FCS (5 %, v/v).

Bezseróvé médium: médium DMEM/F12, penicilin (100 U/l), streptomycin (100 mg/l), L-glutamin (2 mmol/l).

4.2.2.4 Roztoky pro stanovení parametrů oxidačního stresu

GSH pufr: Tris-HCl (0,8 mol/l), EDTA (20 mmol/l), pH 8,9.

Roztok pro stanovení GSH: DTNB (3 mmol/l) v GSH pufru.

GSHred pufr: KH₂PO₄ (0,2 mol/l), EDTA (2 mmol/l), pH 7.

Roztok pro stanovení GSHred: GSH oxidovaný (20 mmol/l) v deionizované vodě. Reakce startuje přidáním NADPH (2 mmol/l) v Tris/HCl (10 mmol/l), pH 7.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

SOD pufr: KH_2PO_4 (50 mmol/l), EDTA (0,1 mmol/l), pH 7,4.

Roztok pro stanovení SOD: NBT (62 $\mu\text{mol/l}$), NADH (98 $\mu\text{mol/l}$) v SOD pufru. Reakce startuje přidáním PMS (33 $\mu\text{mol/l}$) v SOD pufru.

GPx pufr: Tris (50 mmol/l), EDTA (0,1 mmol/l), pH 7,6.

Roztok pro stanovení GPx: GSH (0,3875 mmol/l), NADPH (0,186 mmol/l), GSHred (1,55 U/ml) v GPx pufru. Reakce startuje přidáním kumenhydroperoxidu (10 μl v 10 ml deionizované vody).

GST pufr: Na_2HPO_4 (0,1 mol/l), pH 6,5.

Pracovní roztok pro stanovení GST: GSH redukovaný (20 mmol/l) v deionizované vodě. Reakce se startuje přidáním CDNB (20 mmol/l) v 95% ethanolu.

Pufr na katalasu: KH_2PO_4 (0,05 mol/l); Na_2HPO_4 (0,05 mol/l), pH 7.

Pracovní roztok pro stanovení katalasy: H_2O_2 (0,03 mol/l) v pufru na katalasu.

4.2.3 Přístroje

Analytické váhy XS 205 DR/M (Mettler Toledo, Švýcarsko)

Centrifugy MiniSpin (Eppendorf, Německo)

Fotometr pro měření absorpance v 96-jamkových deskách Sunrise Remote (Tecan, Švýcarsko)

Hlubokomrazicí box VX 380 (Jouan, Francie)

Homogenizátor Ultra-Turax T 25 basic (Ika Werte, Německo)

Chlazená centrifuga Mikro 22 a Rotina 38R (Hettich Zentrifugen, Německo)

Chlazená centrifuga Z 323 K (Hermle Labortechnik, Německo)

Inkubátor Cellstar (Queue System, USA)

Inkubátor INE500 (Mettler, Německo)

Inkubátor R3001 (Rumed, Německo)

Karl-Fischer titrátor DL38 (Mettler Toledo, Švýcarsko)

Laminární box CLF (Schoeller Instruments, Česká republika)

Laminární box NU-437 (Nuair, USA)

Magnetická míchačka IKA RH basic KT/C (Slabo, Česká republika)

Mikrokapalinový chromatograf CapLC spojený s hmotnostním spektrometrem typu Q-TOF (Waters, Velká Británie)

Mikroskop CK40 (Olympus, Japonsko)

Stabilitní box Climacell 707 (BMT, Indie)

Stabilitní box Rumed R4301 (Rumed, Německo)

Termomixer Comfort (Eppendorf, Německo)

Tester rozpadavosti DT2 (Sotax, Švýcarsko)

Tester tablet 8M (Dr.Schleuniger Pharmatron, Švýcarsko)

Třepačka Duomax 1030 a Reax top (Heidolph, Německo)

Třepačka OLS 200 (Grant Instruments, Velká Británie)

Ultrazvuková termostatová vodní lázeň PS 01000A (Notus-Powersonic, Slovensko)

Váhy AX105 DeltaRange (Mettler Toledo, Švýcarsko)

Vakuová rotační odparka s vodní lázní Rotavapor R-3000 (Buchi, Švýcarsko)

Vakuové čerpadlo Vac-ci-space (Chromservis, Slovensko)

Zařízení pro přípravu deionizované vody Ultrapur (Watrex, Česká republika)

4.2.4 Ostatní materiál

Kultivační lahve Nunclon™, kultivační desky, filtry a centrifugační zkumavky (Nunc, Dánsko)

Plastové mikrozukavky (Eppendorf, Německo)

Filtrační papír Whatman (Whatman, USA)

Chromatografické desky pro HPTLC (Merck, Německo)

Aerosil® Rumec Silica (Evonik Industrie, Německo)

Neionomerní polystyren-divinylbenzenový sorbent Sepabeads SP 207 (Mitsubishi Chemical Corp., Japonsko)

Plyny: kyslík, oxid uhličitý, dusík, helium a argon (Linde Technoplyn, Česká republika)

SPE kolonka Strata-Screen-A, směsný sorbent, 200 mg/3 ml (Phenomenex, USA)

SPE kolonka Strata SDB-L, styren-divinylbenzen, 200 mg/3 ml (Phenomenex, USA)

4.3 Statistické hodnocení

Pokud není uvedeno jinak, experimenty *in vitro* byly provedeny v tripletech ve třech nezávislých opakováních. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr $\pm$ SD.

Statistické hodnocení bylo prováděno pomocí aplikace MS Excell 2000 (Microsoft, USA) nebo Studentovým t-testem ($p < 0,05$).

Data intervenční studie byla analyzována s použitím neparametrického Wilcoxon signed-rank testu na hladině významnosti $p < 0,05$.

4.4 Příprava extraktů a frakcí

4.4.1 Příprava ethanolových extraktů

50 g lyofilizovaných plodů (sběr 2006, lyofilizace 3.10.2007, Ar atmosféra) bylo umístěno do kolony. Plody byly zality 500 ml 96% ethanolom a následovala 24 hodin macerace v temnu při pokojové teplotě. Poté byl extrakt slit a vakuově zahuštěn při 55 °C na medovitý odparek, označený jako E1. Macerované plody nebyly podrobeny žádnému mechanickému ždímání. Dále bylo k macerovaým plodů z předchozí extrakce přidáno 300 ml 60% ethanolu, 24 hodin macerováno v temnu při laboratorní teplotě. Opět následovalo vakuové zahuštění při 55 °C na medovitý odparek označený jako E2. Přidáno 200 ml EtOH 60%, 3 hodiny macerace v temnu při laboratorní teplotě. Slito a vakuově zahuštěno při 55 °C. Odparek označen jako E3. Přidáno 200 ml 99% acetonu, 48 hodin macerace v temnu při teplotě 4 °C. Slito a vakuově zahuštěno při 55 °C. Odparek označen jako E4.

4.4.2 Příprava fenolové frakce

Zmrazené plody *L. caerulea* L. (cca 5 kg) byly extrahovány 0,1% H_3PO_4 o teplotě 50 °C v semikontinuálním extraktoru. Získaný extrakt byl převeden na kolonu s polymerním neionogenním sorbentem Sepabeads SP206. Po sorpci anthokyaninových barviv byl sorbent promyt demineralizovanou vodou a fenolové látky byly eluovány ethanolom. Eluát byl vakuově odpařen a lyofilizován. Tímto bylo získáno cca 20 g fenolové frakce označené jako PF.

4.4.3 Extrakce plodů *L. caerulea* L. za dvou různých podmínek

Jako extrakční činidlo byl zvolen 80% ethanol (okyselený). K této „průmyslové“ extrakci byla zároveň provedena (kontrolní) „laboratorní“, při níž byly striktně dodrženy tyto podmínky: zamezení přístupu světla, laboratorní teplota, inertní Ar atmosféra.

Oba typy extrakce byly provedeny takto: První extrakční porce měla objem 400 ml, další dvě porce měly objem po 200 ml extrakčního činidla, vždy po dobu 60 min. Získané

(spojené) surové extrakty byly odpařeny za sníženého tlaku při 40 °C, dosušeny lyofilizací a uschovány při teplotě -25 °C (kontrolní extrakt v Ar atmosféře).

V tabulce 3 je uveden celkový přehled extrakčních podmínek (průmyslový extrakt – označen „P“, laboratorní „L“). Získané extrakty byly testovány na subbuněčných a buněčných systémech pro porovnání jejich biologické aktivity v podmínkách *in vitro*.

Tab. 9: Design „průmyslového“ a „laboratorního“ extrakčního postupu celých plodů *L. caerulea* L.

Extrakční činidlo	Navážka vzorku (g)	Podmínky extrakce	Výtěžek (%) / označení surového extraktu
P: 80% Ethanol / 0,1 % H_3PO_4 (v/v)	50,3	1. porce 400 ml; 2. a 3. porce po 200 ml extrakčního činidla, vždy 60 min, bez Ar atmosféry, přístup vzduchu a světla, laboratorní teplota	59 / typ P
L: 80% Ethanol / 0,1 % H_3PO_4 (v/v)	50,3	1. porce 400 ml; 2. a 3. porce po 200 ml extrakčního činidla, vždy 60 min, Ar atmosféry, tma, laboratorní teplota	54 / typ L

4.5 Zhodnocení vlastností extraktů

Extrakty L a P byly podrobeny srovnání obsahu fenolových kyselin a anthokyaninů a dále testům na subbuněčné a buněčné úrovni.

4.5.1 Stanovení fenolových kyselin

Metoda LC/MS

Vzorky (44 mg) byly rozpuštěny ve fosfátovém pufru (50 mmol/l; 1,5 ml; pH 7) a roztok zfiltrován přes teflonový membránový mikrofiltr (0,45 μm porositá). Vzorek byl nanesen na kondicionovanou SPE kolonku (směsný sorbent RP). Kolona byla promyta 3 ml deionizované vody a eluována 3 ml methanolu a 3 ml 1% HCl v methanolu. Methanolové frakce byly spojeny a odpařeny pod dusíkem při 40 °C. Pevný podíl byl rozpuštěn v mobilní fázi A a analyzován LC/MS, mobilní fáze A: octová kyselina 10 mmol/l, 5 % acetonitril ve vodě (v/v); mobilní fáze B: acetonitril, gradient 0-5 min, 10 % B, 5-25 min, 10-90 % B, 40-45 min, 90-10 % B a 45-50 min, 10 % B. Měření byla provedena na systému pro LC Shimadzu Class VP (Shimadzu Corporation, Japan) s UV detektorem SPD-10AVP a hmotnostním detektorem LCQ Fleet, koloně Gemini C18 (Phenomenex, USA). Nastavení iontového zdroje a optiky bylo optimalizováno podle 4-hydroxybenzoové

kyseliny. Směs standardů (protokatechová, gentisová, 4-hydroxybenzoová, elagová, salicylová, rozmarýnová, ferulová, kávová, dihydrokávová, chlorogenová, 3-hydroxyskořicová, kumarová, vanilová a syringová kyselina) ve čtyřech různých koncentracích (0,01-10 mg/l) byla použita pro získání kalibračních závislostí. Kalibrační závislosti byly lineární ($R \geq 0,990$). Limit detekce byl 1,5 $\mu\text{g/l}$ a limit kvantifikace 10 $\mu\text{g/l}$.

4.5.2 Stanovení anthokyaninů

4.5.2.1 Vysokoúčinná chromatografie na tenké vrstvě (HPTLC)

Pro dělení látek byly použity skleněné desky potažené celulosou 50 HPTLC 20×10 cm (Merk, Německo). Všechny vzorky a standardy byly rozpuštěny v methanolu a nanášeny ručně pipetou v objemu 10 μl vzorku a 2 μl standardu (peonidin-3-glukosid, pelargonidin-3-glukosid a kyanidin-3-glukosid). Desky byly vyvíjeny v horizontální poloze v mobilní fázi A ($\text{HCl}:\text{CH}_3\text{COOH}:\text{H}_2\text{O} - 3:15:82$), následně vyjmuty, vysušeny fénem a vyvíjeny v mobilní fázi B ($\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{COOH} - 40:60$). Po vysušení byly hodnoceny na základě retenčního faktoru.

4.5.2.2 Metoda LC/MS

Vzorky (44 mg) byly rozpuštěny v 1 ml 0,01% HCl. Roztok (0,5 ml) byl nanesen na kondicionovanou SPE kolonku (styren-divinylbenzen). Kolona byla promyta 3 ml 0,01% HCl a anthokyaniny eluovány 3 ml 0,01% HCl v methanolu. Frakce byla odpařena pod dusíkem při 40 °C, pevný podíl rozpuštěn v mobilní fázi A a analyzován LC/MS, mobilní fáze A: 0,12% trifluoroctová kyselina, 5% acetonitril ve vodě (v/v); mobilní fáze B: 0,12% trifluoroctová kyselina v acetonitrilu, gradient 0-35 min, 10-90 % B, 35-40 min, 90 % B. Měření byla provedena na systému *Shimadzu Class VP* (Shimadzu Corporation, Japan) s UV detektorem *SPD-10AVP* a hmotnostním detektorem *LCQ Fleet*, koloně *Gemini C18* (Phenomenex, USA). Ke kvantifikaci anthokyaninů byl použit standard malvidin-3-glukosidu v koncentračním rozmezí 5-100 mg/l. Kalibrační závislost byla lineární ($R = 0,994$). Faktory odezvy jednotlivých barviv byly zanedbány. Limit detekce byl 1,5 $\mu\text{g/l}$, limit kvantifikace 10 $\mu\text{g/l}$.

4.5.3 Stanovení redukční kapacity

Pro stanovení redukční kapacity byla zvolena metoda pomocí Folin-Ciocalteuova činidla za těchto podmínek:

Vzorky byly rozpuštěny v PBS (10 mg/ml), třepány 30 s a následně na 5 min vloženy do ultrazvukové lázně. Jako standard byla použita galová kyselina (1 mg/ml). Reakční směs: 5 μ l vzorku/standardu/pufu a 100 μ l Folin-Ciocalteuova roztoku (10 $\times$ zředěného) bylo napipetováno na mikrotitrační destičku, nechalo se stát 5 min, a poté bylo přidáno 100 μ l roztoku uhličitanu sodného (75 g/l). Následovala inkubace 90 min při laboratorní teplotě a naměření absorbance při 725 nm. Redukční kapacita se vypočítala z kalibrační křivky galové kyseliny jako její ekvivalent.

4.5.4 Stanovení zhášení DPPH radikálu

Antiradikálová aktivita se stanovila metodou zhášení radikálu 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazylu (DPPH).

Na mikrotitrační destičku bylo do jamek napipetováno 90 μ l roztoku testovaného extraktu v methanolu v koncentracích 0-100 μ g/ml, poté bylo přidáno 180 μ l roztoku DPPH v methanolu (20 μ g/ml) a po 30 minutách byla změřena absorbance při 517 nm. Z kalibrační křivky byla odečtena hodnota IC₅₀.

4.5.5 Stanovení cytotoxicity na buněčných modelech

Cytotoxicita byla sledována na lidských endotelových buňkách (HUVEC) po 4 a 24 h. Sledovanými parametry byla redukce MTT, uvolnění LDH do média a stanovení produktů peroxidace lipidů.

4.5.5.1 Izolace lidských endotelových buněk

HUVEC byly izolovány z pupečních šňůr žen (18-35 let) po fyziologickém porodu na Porodnicko-gynekologické klinice Fakultní nemocnice Olomouc. Všechny dobrovolnice podepsaly informovaný souhlas s odběrem a splňovaly kritéria pro zařazení do studie. Studie byla schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci (č.j. 39/05) a probíhala v souladu s principy Mezinárodní etické komise pro biomedicínský výzkum (CIOMS, Ženeva 1993). Po porodu byla pupeční šňůra ustřížena (minimálně 10 cm), vložena do sterilního EBS s antibiotiky a uchována při 4 °C. Endotelové buňky byly izolovány kolagenasovou digescí maximálně do 20 hod. od porodu. Šňůra byla promyta EBS, naplněna roztokem kolagenasy v EBS (15 min, 37 °C), promyta

sterilním Hanksovým pufrům bez Ca^{2+} a Mg^{2+} a izolované buňky přemístěny do kultivačního média s růstovými faktory a antibiotiky. HUVEC byly kultivovány v kultivačních lahvích potažených 0,2% želatinou. Vzhledem k tomu, že po osmé pasáži dochází k nezvratné změně morfologie, byly v experimentech používány buňky mezi 2.-7. pasáží.

4.5.5.2 Primární kultury endotelových buněk

Buňky byly uchovány v inkubátoru nasyceném vodními parami při 37 °C a v atmosféře 5% CO_2 , médium bylo měněno každých 48-72 hod. Po dosažení konfluence byly buňky opláchnuty sterilním PBS (5 ml), uvolněny inkubací s 0,25% roztokem trypsinu s EDTA (0,5 ml; 1-2 min; 37 °C), centrifugovány s 5-10 ml centrifugačního média (10 min, 152 g, pokojová teplota), resuspendovány v 10 ml kultivačního média a poté použity do experimentů.

Kultivační desky byly potaženy 0,2% želatinou (100 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$). Po zatuhnutí želatiny (30 min, 37 °C) byl sterilně odsát nadbytek roztoku. Buňky byly vysévány v koncentraci 3×10^4 buněk/ml v růstovém médiu a uchovávány v inkubátoru nasyceném vodními parami při 37 °C. Po dosažení konfluence (3-4 dny) bylo 16 hod. před zahájením pokusu kultivační médium vyměněno za stabilizační a následující den přidávány testované látky.

4.5.5.3 MTT test

Tetrazoliová sůl 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromid (MTT) je mitochondriálními dehydrogenasami metabolicky aktivních buněk redukována na formazanové barvivo, jehož koncentrace je po rozpuštění v organickém rozpouštědle stanovena spektrofotometricky při 540 nm.

Po opláchnutí buněk sterilním roztokem PBS bylo do jamek napipetováno 100 μl čestvého bezsérového média a 10 μl roztoku MTT (5 mg/ml; PBS). Po inkubaci (37 °C; 5% CO_2) bylo médium s MTT odsáto, do jamek aplikováno 200 μl DMSO s 1% amoniakem a po 5 minutách byla změřena absorbance při 540 nm. Životnost buněk byla vypočítána ze vztahu:

$$\text{Životnost (\%)} = \frac{A_v}{A_s} \cdot 100$$

A_v ... absorbance vzorku, A_s ...absorbance kontroly

4.5.5.4 LDH test

Pokud mají buňky porušenou membránu, uvolňují do média laktátdehydrogenasu. V reakční směsi obsahující pyruvát dochází k přeměně NADH na NAD⁺, čímž dochází k poklesu absorbance, měřené při 314 nm po dobu 4 min.

Aktivita LDH v médiu byla stanovena v 50 μ l vzorku po přidání 150 μ l pracovního roztoku a vypočítána ze vztahu:

$$\text{aktivita } (\mu\text{kat} \cdot \text{l}^{-1}) = \frac{\Delta A_{\text{min}}}{\varepsilon \cdot L} \cdot \text{ředění}$$

ΔA_{min} ... změna absorbance (za minutu) při 340 nm; ε ... molární absorpční koeficient ($\text{l/mol} \cdot \text{cm}$); L ... délka optické dráhy (cm).

Životnost buněk byla vypočítána podle vztahu:

$$\text{Životnost (\%)} = \frac{\text{Aktivita}_s}{\text{Aktivita}_v} \cdot 100$$

aktivita_v ... aktivita vzorku, aktivita_s ... aktivita kontroly

4.5.5.5 Stanovení produktů peroxidace lipidů

Vzorek média (500 μ l) byl zahříván (30 min., 90 °C) se 700 μ l roztoku TBA (26 mmol/l) - TCA (918 mmol/l). Koncentrace látek reagujících s thiobarbiturovou kyselinou (TBARS) byla stanovena po centrifugaci (10 min., 900 g) změřením absorbance supernatantu při 535 nm.

Koncentrace TBARS, hodnocených jako malondialdehyd, byla vypočítána podle vztahu:

$$c (\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}) = \frac{A_{535 \text{ nm}}}{\varepsilon \cdot L} \cdot \text{ředění}$$

A_{535} ... absorbance vzorku při 535 nm; ε ... molární absorpční koeficient ($\text{l/mol} \cdot \text{cm}$); L ... délka optické dráhy (cm).

4.6 Stabilitní studie

Cílem stabilitních studií (SS) bylo ověření kvality produktu v závislosti na čase s vlivem různých faktorů okolního prostředí, jako jsou teplota a vlhkost. Informace o stabilitě jsou východiskem pro stanovení doby použitelnosti a doporučení podmínek uchovávání finálního produktu.

4.6.1 Názvy, popis a složení testovaných přípravků

LONICERA

Potažené tablety protáhlé – bikonvexní, fialové barvy.

Složení: *Lonicera caerulea* - lyofilizované plody (300 mg v 1 tabletě), mikrokrytalická celuloza, hydrogenfosforečnan vápenatý, karboxymethylceluloza sodná, stearat hořečnatý, oxid křemičitý koloidní, směs potahovací Aquapolish violet 054.03.MS.

DENOXINAL NEW

Potažené tablety protáhlé – bikonvexní, zelené barvy.

Složení: *Vaccinium macrocarpon* – extrakt Hi-PAC 4.0 (standardizovaný na 4 % proanthokyanidinů;133,33 mg), *Silybum marianum* extrakt (33,33 mg), *Linum usitatissimum* extrakt (133,33 mg), hydrogenfosforečnan vápenatý, mikrokrytalická celuloza, karboxymethylceluloza sodná, stearat hořečnatý, oxid křemičitý koloidní, směs potahovací Aquapolish green 070.19/902095-L.

URINAL NEW

Potažené tablety kulaté – bikonvexní, fialové barvy.

Složení: *Vaccinium macrocarpon* – extrakt Cysticran (standardizovaný na 40 % proanthokyanidinů;90 mg), mikrokrytalická celuloza, hydrogenfosforečnan vápenatý, karboxymethylceluloza sodná, stearat hořečnatý, oxid křemičitý koloidní, koncentrát barvicí červený Exberry Shade cherry red No. 158413, směs potahovací Aquapolish violet 054.03.MS.

URINAL AKUT

Potažené tablety protáhlé – bikonvexní, fialové barvy.

Složení: *Vaccinium macrocarpon* – extrakt Hi-PAC 4.0 (standardizovaný na 4 % proanthokyanidinů; 450 mg), mikrokrytalická celuloza, hydrogenfosforečnan vápenatý, karboxymethylceluloza, stearat hořečnatý, oxid křemičitý koloidní, talek, hydroxypropylmethylceluloza, hydroxypropylceluloza, , triglyceridy, barviva: oxid titaničitý, indigotin, azorubin.

4.6.2 Použité šarže, obaly, podmínky a délka stabilitních studií

Do stabilitních testů byly použity pilotní šarže výše uvedených přípravků. Jako primární obaly byly použity kontejnery PET (polyethylentereftalát) 75 ml s víčkem LDPE (polyethylen s nízkou hustotou) nebo blistrovací plastová folie PVC/PVdC (polyvinylchlorid/polyvinylidenchlorid) s hliníkovou folií. U všech přípravků byly založeny dlouhodobé stabilitní studie. Dále byly založeny zrychlené nebo střednědobé stabilitní studie, dle charakteru přípravku. Použité primární obaly, šarže, podmínky, délka a datum založení jednotlivých studií jsou uvedeny v Tab. 10.

Tab. 10: Použité šarže, primární obaly, podmínky, délka SS

Č. studie	Primární obal	Název přípravku	Šarže	Teplota (°C)	Vlhkost (% RV)	Délka (měsíce)
346	kontejner	URINAL AKUT	5503043-3	40 ± 2	75 ± 5	6
347	kontejner	URINAL AKUT	5503043-3	25 ± 2	60 ± 5	36
348	kontejner	URINAL AKUT	5503043-4	40 ± 2	75 ± 5	6
349	kontejner	URINAL AKUT	5503043-4	25 ± 2	60 ± 5	36
536	blistr	LONICERA	V9A0117	25 ± 2	60 ± 5	36
537	blistr	LONICERA	V9A0117	30 ± 2	65 ± 5	12
542	kontejner	LONICERA	V9A0117	25 ± 2	60 ± 5	36
543	kontejner	LONICERA	V9A0117	30 ± 2	65 ± 5	12
579	blistr	DENOXINAL NEW	V9E0214	25 ± 2	60 ± 5	36
580	blistr	DENOXINAL NEW	V9E0214	30 ± 2	65 ± 5	12
638	blistr	URINAL NEW	V9L0385	25 ± 2	60 ± 5	36
639	blistr	URINAL NEW	V9L0385	30 ± 2	65 ± 5	12

4.6.3 Frekvence testování

Jednotlivé stabilitní studie byly plánovány na celkovou dobu 3, 12 nebo 36 měsíců. Vstupní analýzy byly provedeny po výrobě a dodání vzorků. Následující časové body a doba testování od zahájení studie jsou uvedeny v Tab. 11.

Tab. 11: Frekvence testování a časové body stabilitních studií

	Typ studie		
	Zrychlená	Střednědobá	Dlouhodobá
časový bod	čas (měsíc)		
T0	0	0	0
T1	3	3	3

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

T2	6	6	6
T3	-	9	9
T4	-	12	12
T5	-	-	18
T6	-	-	24
T7	-	-	36

4.6.4 Atributy, postupy a kritéria přijatelnosti testování

Rozsah testování pokrývá fyzikální, chemické a v případě Urinal Akut také mikrobiologické atributy produktu. Kritéria přijatelnosti jsou odvozeny od limitů platných při propouštění ve společnosti Walmark.

Tab. 12: Parametry a metody hodnocení u přípravků Urinal New, Denoxinal New a Lonicer

Parametr	Limitní hodnoty	Metoda (Walmark)
Forma	Potahovaná tableta	M/KJ/0017
Tvar	Tableta, dle specifikace	M/KJ/0017
Barva	Dle specifikace	M/KJ/0017
Výška tablety	---	M/KJ/0056
Průměrná hmotnost tablety	---	M/KJ/0003
Pevnost tablet	---	M/KJ/0063
Rozpadavost tablet	Max. 30 min	M/KJ/0004
Obsah vody	---	Kf.

Tab. 13: Parametry a metody hodnocení u přípravku Urinal Akut

Parametr	Limitní hodnoty	Metoda (Walmark)
Forma	Potahovaná tableta	SM-0002
Tvar	Tablety protáhlé, bikonvexní	SM-0002
Barva	Fialová	SM-0002
Výška tablety	4,9 – 5,7 mm	AM-0032
Průměrná hmotnost tablety	808 – 892 mg	AM-0011
Pevnost tablet	Min. 170 N	AM-0031
Rozpadavost tablet	Max. 30 min	AM-0039
Obsah vody	---	Kf.
Obsahové látky		

Parametr	Limitní hodnoty	Metoda (Walmark)
Celkové fenolové sloučeniny		
Proanthokyanidiny		
Mikrobiologická čistota: Kat. 3B		ČL 2002
Bakterie	Max. 104 CFU / g	ČL (2.6.12)
Houby	Max. 102 CFU / g	ČL(2.6.12)
Enterobakterie a jiné G-	Max. 102 CFU / g	ČL (2.6.12)
<i>Salmonella</i>	Negativní / 10 g	ČL (2.6.12)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Negativní / g	ČL (2.6.12)
<i>E. coli</i>	Negativní / g	ČL (2.6.12)

4.6.5 Stanovení redukční kapacity

Pro sledování stability obsahu sloučenin s antioxidačními vlastnostmi v extraktu *V. macrocarpon* Ait. v tabletách Urinal Akut (s obsahem komerčního extraktu Hi-PAC 4.0) byla zvolena metoda stanovení redukční kapacity pomocí Folin-Ciocalteuova činidla. Vzorky tablet byly rozdrceny v třecí misce, rozpuštěny v PBS (10 mg/ml) a následně bylo postupováno dle metody popsané v kapitole 4.5.3. Redukční kapacita se vypočítala z kalibrační křivky galové kyseliny jako její ekvivalent v tabletě.

4.6.6 Stanovení obsahu proanthokyanidinů

4.6.6.1 Úprava vzorku

Před analýzou byl z tablet mechanicky odstraněn potah (ručním oškrábáním svrchní vrstvy). Vnitřní část tablety byla rozdrcena v porcelánové třecí misce a rozetřena na jemný prášek. Množství práškového materiálu odpovídající jedné tabletě bylo odváženo na analytických vahách (820 mg). Navážené množství bylo rozpuštěno v 10 ml deionizované vody, 1 min vortexováno, sonifikováno 2 minuty v ledové lázni a centrifugováno (5 min, 3000 ot/min).

Supernatant byl extrahován 3x 10 ml ethylacetátu a spojené extrakty byly odpařeny jemným proudem dusíku (teplota při odpařování nepřesáhla 30°C). Vzniklý odparek byl uchován při -20°C.

Odparek byl před analýzou ponechán 5 minut při laboratorní teplotě a následně rozpuštěn v 1 ml methanolu. Vzniklý roztok byl sonikován 5 minut v ledové lázni. Dále byl vzorek podroben analýze μ LC/MS.

4.6.6.2 Analýza μ LC/MS:

Pro analýzu byl použit mikrokapalinový chromatograf CapLC spojený s hmotnostním spektrometrem typu Q-TOF (Waters) - ionizace elektrosprejem, Z-sprej, s kolonou Allure Biphenyl 60A, 3 μ m (0.3 mm I.D. x 15 cm), Restek Corp. Mobilní fáze A - 5,7 mM octová kyselina + 5% (v/v) acetonitril ve vodě, mobilní fáze B – acetonitril. Binární gradient: 0-5 min 90% A; 5-40 min 90%-10% A; 40-45 min 90% A; 45-50 min 10-90% A; 50-60 min 90% A, průtok: 4 μ l/min. Podmínky ESI ionizace byly: sprejovací napětí +3,6kV, teplota zdroje 100°C, teplota desolvačního plynu 200 °C, průtok zmlžovacího plynu: 50 l/h; desolvačního plynu 450 l/h.

Sběr MS dat: voleny dvě skenovací události: 1. sken $m/z=50-1300$, kolizní energie (5 V), 2. sken $m/z = 50-1300$, rampa kolizní energie (15-50 V). Pro potřeby identifikace byly v odpovídajících experimentech přidány ještě skenovací události zahrnující izolaci rodičovského iontu v prvním kvadrupólu hmotnostního analyzátoru a jeho fragmentaci v kolizní cele (kolizní energie stejná jako u 2. skenu).

Pro vyhodnocení byly z prvního typu skenu rekonstruovány chromatogramy pro odpovídající hodnoty m/z sledovaných proanthokyanidinů (PA):

1. monomer (epikatechin-katechin) – m/z 291
2. PA dimer typu A – m/z 577
3. PA trimer typu A - m/z 865
4. PA tetramer typu A – m/z 1153

Pro kvantifikaci byla provedena integrace pík z rekonstruovaných chromatogramů eluujících v odpovídajících časech a plochy přepočítány na obsah katechinu (metoda kalibrační přímky), byla proměřena kalibrační závislost obsahu katechinu na čtyřech koncentračních úrovních v rozsahu koncentrací 10 – 75 mg/l ($R^2 = 0,988$), získané hodnoty byly přepočteny na použité zředění a vztaženy na navážku. Při výpočtu nejsou zohledněny rozdíly v odezvových faktorech katechinu a analyzovaných PA z důvodu nedostupnosti definovaných standardů. Získané obsahy jsou uvedeny formou histogramů s odpovídající chybovou úsečkou (interval spolehlivosti, $\alpha = 0,05$; 4 opakování, odlehlé hodnoty byly ze zpracování vyloučeny).

4.7 Intervenční studie

4.7.1 Design studie

Do intervenční studie bylo zapojeno deset zdravých dobrovolníků, nekuřáků, zaměstnanců Univerzity Palackého v Olomouci (8 žen, 2 muži; 25-39 let; BMI $22,9 \pm 2,0$). Studie byla schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Všichni dobrovolníci podepsali informovaný souhlas, byli seznámeni s cílem studie a poučeni, aby nekonzumovali potraviny a nápoje bohaté na fenolové sloučeniny, zejména plodiny bohaté na anthokyaniny, pokrmy s větším množstvím ovoce a zeleniny a rovněž kávu, čaj, víno a pivo 24 hodin před začátkem studie a během celé doby studie.

Dobrovolníci konzumovali 165 g rozmražených plodů *L. caerulea* L. (ekv. 208 mg anthokyaninů/den) po dobu sedmi dní. Venózní krev a moč byly odebrány před začátkem a dvě hodiny po konzumaci poslední dávky plodů. Po odběru vzorku venózní krve byl změřen krevní tlak. Ve všech vzorcích byly změřeny základní biochemické parametry (močovina, kreatinin, bilirubin, ALT, AST, GGT, CRP, cholesterol, triacylglyceroly, HDL, HDL-cholesterol, LDL, glukosa), produktů pokročilé oxidace proteinů (AOPP) a oxidovaného LDL (OxLDL) na Ústavu klinické biochemie a imunogenetiky Fakultní nemocnice Olomouc s využitím analyzátoru Hitachi Modular Evo P (Hitachi, Japan) a standardní analýza moči byla provedena na zařízení IQ200 Automated Urinalysis System (IRIS International, Inc., USA). GSH, GSHred, GST, GPx, SOD, katalasa a hodnoty TBARS byly analyzovány v erytrocytech; celková antioxidační kapacita, obsah SH-skupin a TBARS byly stanoveny v plazmě [158].

Obsah fenolových kyselin, flavonolů a anthokyaninů byl stanoven v plodech, plazmě a moči pomocí HPLC/DAD-ESI-MS (kapitola 4.7.4.1).

4.7.2 Stanovení parametrů oxidačního stresu

4.7.2.1 Příprava vzorků

Erytrocyty – před stanovením byl připraven 10% a 1% lyzát v PBS.

Plazma byla použita ke stanovení přímo.

4.7.2.2 Stanovení produktů lipoperoxidačního poškození

Princip stanovení viz kapitola 4.5.5.5.

100 μ l plazmy / 200 μ l lyzátu erytrocytů bylo smícháno s 1000 μ l směsi TBA - TCA a zahřáto (30 min, 90 °C). Po ochlazení a centrifugaci (6740 g, 10 min, 4 °C) byla měřena absorbance. Množství produktů lipoperoxidačního poškození (TBARS) vztažené na malondialdehyd bylo vypočítáno podle vztahu:

$$\text{Koncentrace TBARS (nmol} \cdot \text{g}^{-1}) = \frac{(A_a - A_b)}{\varepsilon \cdot L \cdot c} \cdot \text{ředění}$$

A_a ... absorbance vzorku; A_b ... absorbance nepovařeného vzorku; ε ... molární absorpční koeficient MDA (l/mol.cm); L ... délka optické dráhy (cm); c ... koncentrace hemoglobinu (g/l).

4.7.2.3 Stanovení glutathionu (GSH)

Množství GSH bylo stanoveno na základě reakce s 5,5'-dithio-bis(benzoovou) kyselinou (DTNB) v alkalickém prostředí na 5-thio-2-nitrobenzoát (TNB). Absorbance produktu byla měřena při 412 nm [159].

400 μ l lyzátu erytrocytů bylo přidáno ke 100 μ l 25% TCA, promícháno na vortexu a centrifugováno (15 min, 4120 g, 4 °C). Ke 20 μ l supernatantu/ 5% TCA (slepý vzorek) bylo přidáno 200 μ l pracovního roztoku a reakce byla nastartovaná přidávkem 10 μ l DTNB. Po 4 min byla změřena absorbance. Množství GSH bylo vypočítáno podle vztahu:

$$\text{Koncentrace GSH (mmol} \cdot \text{g}^{-1}) = \frac{(A_a - A_b)}{\varepsilon \cdot L \cdot c} \cdot \text{ředění}$$

A_a ... absorbance vzorku; A_b ... absorbance slepého vzorku; ε ... molární absorpční koeficient (l/mol.cm); L ... délka optické dráhy (cm); c ... koncentrace proteinů nebo hemoglobinu (g/l).

4.7.2.4 Stanovení koncentrace SH-skupin

Hladina SH-skupin byla stanovena dle Hu, 1994 [160]. Metoda využívá stejný princip jako stanovení GSH (viz kapitola 4.7.2.3).

100 μ l plazmy bylo smícháno s 300 μ l GSH pufru, 20 μ l DTNB (4 mg/l), 1580 μ l methanolu a vše bylo promícháno na vortexu. Po inkubaci (20 min, 4 °C) byl vzorek

centrifugován (10 min, 610 g, 4 °C) a absorbance změřena při 412 nm. Koncentrace celkových SH-skupin byla vypočítána podle vztahu:

$$\text{Koncentrace SH-skupin } (\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}) = \frac{(A_{\text{vz}} - A_{\text{a}} - A_{\text{b}})}{\varepsilon \cdot L \cdot c} \cdot \text{ředění}$$

A_{vz} ... absorbance vzorku; A_{a} ... absorbance vzorku obsahujícího vše kromě DTNB; A_{b} ... absorbance vzorku obsahujícího vše kromě plazmy; ε ... molární absorpční koeficient (l/mol.cm); L ... délka optické dráhy (cm); c ... koncentrace proteinů (g/l).

4.7.2.5 Stanovení aktivity superoxiddismutasy (SOD)

Aktivita SOD byla stanovena nepřímo v systému NBT/NADH/PMS. Reakční směs produkuje superoxidový anion, který reaguje s tetrazoliovou solí. Absorbance produktu byla měřena při 560 nm [161].

K 1% lyzátu erytrocytů bylo přidáno 200 μl roztoku pro stanovení superoxiddismutasy v pufru. Reakce byla spuštěna přidavkem 25 μl PMS (33 $\mu\text{mol/l}$). Po 5 min byla měřena absorbance. Aktivita SOD byla vypočítána podle vztahu:

$$\text{Aktivita SOD (U/g)} = \frac{(A_{\text{a}} - A_{\text{b}}) - (A_{\text{vz}} - A_{\text{b}})}{(A_{\text{a}} - A_{\text{b}}) \cdot \varepsilon \cdot L \cdot c} \cdot \text{ředění}$$

A_{vz} ... absorbance vzorku; A_{a} ... absorbance slepého vzorku (25 μl slepého extraktu a 200 μl směsi NBT s NADH); A_{b} ... absorbance pozadí (250 μl SOD pufru); ε ... molární absorpční koeficient (l/mol.cm); L ... délka optické dráhy (cm); c ... koncentrace hemoglobinu (g/l).

4.7.2.6 Stanovení aktivity glutathionperoxidasy (GPx)

Ke stanovení aktivity GPx byl použit systém GSH/glutathionreduktasa/NADPH/kumenhydroperoxid. V reakci katalyzované GPx je GSH oxidován a vznikající GSSG je zpětně redukován glutathionreduktasou za spotřeby NADPH, jehož pokles je měřen při 340 nm [162].

Ke 20 μl 1% lyzátu erytrocytů bylo přidáno 200 μl roztoku pro stanovení GPx. Po inkubaci (5 min, 37 °C) bylo přidáno 10 μl kumenhydroperoxidu a byla měřena změna absorbance za 1 min. Aktivita GPx byla vypočítána podle vztahu:

$$\text{Aktivita GPx } (\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}) = \left(\frac{\Delta A_{\text{min}}}{c \cdot \varepsilon \cdot L} \right) \cdot \text{ředění}$$

$\Delta A_{\min}$... změna absorbance (min) při 340 nm; c ... koncentrace hemoglobinu (g/l); ϵ ... molární absorpční koeficient (l/mol.cm); L ... délka optické dráhy (cm).

4.7.2.7 Stanovení aktivity katalasy

Ke stanovení aktivity katalasy byl použit systém obsahující peroxid vodíku. V reakci katalyzované katalasou je peroxid přeměněn na vodu a jeho úbytek je měřen při 240 nm [163].

40 μ l 1% lyzátu erytrocytů bylo smícháno s 1960 μ l pufru. Reakce byla nastartována 0,5 ml peroxidu vodíku (0,03 mol/l) a změna absorbance měřena při 240 nm po dobu 30 sekund. Aktivita katalasy byla vypočítána podle vztahu:

$$\text{Aktivita katalasy (mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}) = \left(\frac{(\Delta A_{\min})}{(c \cdot \epsilon \cdot L)} \right) \cdot \text{ředění}$$

$\Delta A_{\min}$... změna absorbance (min) při 240 nm; c ... koncentrace hemoglobinu (g/l); ϵ ... molární absorpční koeficient (l/mol.cm); L ... délka optické dráhy (cm).

4.7.2.8 Stanovení aktivity glutathionreduktasy (GSHred)

Ke stanovení aktivity GSHred byl použit systém GSSG/NADPH/ GSHred. Při reakci dochází ke spotřebě NADPH přímo úměrně obsahu GSHred, který je měřen fotometricky při 340 nm [164].

K 5 μ l 10% lyzátu erythrocytů bylo přidáno 175 μ l GSH pufru, 10 μ l GSSG (20 mmol/l v deionizované vodě). Reakce byla nastartovaná přidavkem 10 μ l NADPH (2 mmol/l v roztoku pro stanovení GSHred) a změna absorbance za 1 min měřena při 340 nm. Aktivita GSHred byla vypočítána podle vztahu:

$$\text{Aktivita glutathionreduktasy (}\mu\text{kat/l)} = \left(\frac{(\Delta A_{\min})}{(c \cdot \epsilon \cdot L)} \right) \cdot \text{ředění}$$

$\Delta A_{\min}$... změna absorbance (min) při 340 nm; c ... koncentrace proteinů (g/l); ϵ ... molární absorpční koeficient (l/mol.cm); L ... délka optické dráhy (cm).

4.7.2.9 Stanovení aktivity glutathiontransferasy (GST)

Ke stanovení aktivity GST byl použit systém CDNB/GSH/GST. Při reakci vzniká konjugát CDNB s glutathionem. Jednotka enzymové aktivity je definována jako množství

enzymu, které katalyzuje tvorbu 1 μmol S-2,4-dinitrofenylglutathionu za minutu [165, 166].

K 10 μl erytrocytů (10% lyzátu) bylo přidáno 170 μl pufru a 10 μl GSH (20 mmol/l v deionizované vodě). Reakce byla spuštěna přidávkem 10 μl CDNB (20 mmol/l v 95% ethanolu) a ihned byla měřena změna absorbance při 340 nm. Aktivita glutathiontransferasy byla vypočítána podle vztahu:

$$\text{Aktivita glutathiontransferasy } (\mu\text{kat/l}) = \left(\frac{(\Delta A_{\text{min}})}{(c \cdot \varepsilon \cdot L)} \right) \cdot \text{ředění}$$

ΔA_{min} ... změna absorbance (min) při 340 nm; c ... koncentrace hemoglobinu (g/l);
 ε ... molární absorpční koeficient (l/mol.cm); L ... délka optické dráhy (cm).

4.7.2.10 Stanovení koncentrace hemoglobinu

Metoda je založena na reakci hemoglobinu s kyanidem za vzniku kyanomethemoglobinu, jehož koncentrace je přímo úměrná koncentraci hemoglobinu a měří se spektrofotometricky při 540 nm [167].

K 10 μl erytrocytů (1% a 10% lyzátu) bylo přidáno 200 μl pracovního roztoku a po 10 min byla změřena absorbance při 540 nm. Množství hemoglobinu bylo vypočítáno podle vztahu:

$$\text{Koncentrace hemoglobinu (mmol/l)} = \frac{(A_a - A_b)}{\varepsilon \cdot L} \cdot \text{ředění}$$

A_a ... absorbance vzorku; A_b ... absorbance slepého vzorku (PBS); ε ... molární absorpční koeficient (l·m/l·cm⁻¹); L ... délka optické dráhy (cm).

4.7.2.11 Stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové

Stanovení je založeno na tvorbě komplexu mezi barvivem (Coomassie brilliant blue G-250) a proteiny ve vzorku. Barvivo se vyskytuje ve třech formách: kation (470 nm), neutrální molekula (650 nm) a anion (595 nm). Vazba proteinu stabilizuje aniontovou formu a vyvolává změnu zbarvení, která je změřena při 595 nm [168].

K 10 μl standardu / vzorku bylo přidáno 100 μl pracovního roztoku a po promíchání byla měřena absorbance. Hodnota byla odečtena z kalibračního grafu.

4.7.3 LC/MS stanovení anthokyaninů, fenolových kyselin

Obsah anthokyaninů v plazmě a moči a fenolových kyselin v plazmě byl stanoven LC/MS analýzou. Limit detekce byl 1,5 µg/l a limit kvantifikace 10 µg/l.

4.7.3.1 Stanovení fenolových kyselin

Plazma byla naředěna fosfátovým pufrém (NaH_2PO_4 , 50 mmol/l, pH 7,0) v poměru 1:1. Roztok byl zfiltrován přes teflonový membránový mikrofiltr (porozita 0,45 µm). Takto připravené vzorky (1 ml) byly naneseny na kondicionovanou (methanol, fosfátový pufr) SPE kolonu (směsný sorbent, Strata Screen A). Kolona byla promyta 3 ml deionizované vody a eluována 3 ml methanolu a 3 ml 1% HCl v methanolu. Oba eluáty byly spojeny a odpařeny pod dusíkem při maximálně 35 °C. Odparek byl rozpuštěn v 0,25 ml mobilní fáze A a analyzován LC/MS.

LC analýza byla provedena na kapalinovém chromatografu *Shimadzu Class VP* stejně jako v kapitole 4.5.2.2.

4.7.3.2 Stanovení anthokyaninů

Plazma byla smíchána s 0,01% HCl v poměru 1:1. Roztok byl zfiltrován přes teflonový membránový mikrofiltr (porozita 0,45 µm) a nanesen (0,5 ml) na kondicionovanou (methanol, 0,01% HCl) SPE kolonu (styren-divinylbenzen). Kolona byla promyta 3 ml 0,01% HCl a anthokyaniny eluovány 3 ml 0,01% HCl v methanolu. Eluát byl odpařen pod dusíkem při maximálně 35 °C a odparek rozpuštěn v 0,25 ml mobilní fáze A (0,12% TFA a 5% acetonitril) a analyzován LC/MS.

Moč (0,25 ml) byla smíchána s příslušnou mobilní fází A (0,25 ml), vortexována 1 min a centrifugována 10 min při 13 000g, 4 °C. Supernatant byl aplikován na LC kolonu (*Gemini C18*).

LC analýza byla provedena na kapalinovém chromatografu *Shimadzu Class VP* stejně jako v kapitole 4.5.2.2.

4.7.4 Příprava vzorků moči pro HPLC analýzu a enzymatické štěpení

Analýza volných sloučenin v moči. Vzorky moči (160 µl) byly smíchány s 240 µl MeOH (1 % octová kys., v/v) a centrifugovány 3 min. (14 000 g), při pokojové teplotě) v přístroji Minispin Plus (Eppendorf, Hamburg, Německo) a supernatant byl analyzován pomocí HPLC/DAD-ESI-MS.

Analýza celkových sloučenin v moči. Vzorky moči (160 μ l) byly smíchány s 40 μ l 1M octanového pufru, pH 5,0 + 4 μ l glukuronidasy/arylsulfatasy (40/20 U/ml, standardizovaný roztok výrobce Merck, K41682514) + 4 μ l H1-sulfatasy výrobce Sigma-Aldrich, S9626 (1000 U/ml, rozpuštěné v 0,2 M octanového pufru, pH 5,0). Zdroj enzymu byl *Helix pomatia*. Po 30 min při 37 °C byly inkubované směsi smíchány s 200 μ l methanolu (1% kys. octová, v/v) a centrifugovány (14 000 g) 3 min při pokojové teplotě. Supernatanty (10 μ l) byly analyzovány pomocí HPLC/DAD-ESI-MS.

4.7.4.1 HPLC/DAD-ESI-MS

HPLC chromatografický systém Dionex UltiMate 3000 (Dionex Corp., Sunnyvale, California, USA) byl vybaven odplyňovačem (SRD-3400, 4 DEGASSER CH), binární pumpou (HPG-3400SD), automatickým dávkovačem (WPS-3000 TSL ANALYTICAL), kolonovou částí (TCC-3000RS) a detektorem s diodovým polem - DAD (DAD-3000, 190-400 nm).

Byla použita chromatografická kolona (150 mm $\times$ 2,0 mm, 5 μ m) Gemini C18 110A s C18 předkolonou (4 mm $\times$ 2 mm, 5 μ m) od výrobce Phenomenex (USA). Vstřikovaný objem byl 10 μ l a mobilní fáze byla složena z acetonitrilu (kapalina B)/10 mM kyseliny octové v 5 % (v) acetonitril ve vodě, lineární gradientová eluce (% v): 0-3 min (10 % B), 3-20 min (10-40 % B), 20-20,1 min (40-90 % B), 20,1-22 min (90 % B), 22-22,1 min (90-10 % B), 22,1-28 min (10 % B). Průtok mobilní fáze byl 0,4 mL/min, teplota automatického dávkovače byla 10 °C a kolonové části 25 °C.

Pro analýzu byl použit hmotnostní spektrometr LCQ fleet vybavený kvadrupolem s lineární iontovou pastí (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) pracující v negativním ESI módu. Parametry ESI-MS byly: napětí spreje 4,75 kV, teplota kapiláry 210 °C a napětí kapiláry -1V. Jako kolizní plyn bylo použito helium. Parametry průtoku plynu byly 60,5 a 2 relativních jednotek. MS² fragmenty byly izolovány z následujících mateřských iontů: 137, 151, 153, 163, 165, 167, 178, 181, 193 m/z; normalizovaná kolizní energie byla 25.

Parametry HPLC/DAD-ESI-MS pro kvalitativní analýzu studovaných látek (celkem 37) jsou uvedeny v Tab. 14. Kvantifikace sloučenin byla vypočtena z kalibrační křivky v rozmezí od 7,5 ng do 10 μ g na nástřik.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Tab. 14: Analyzované sloučeniny v intervenční studii a parametry HPLC/DAD-ESI-MS.

Sloučenina (triviální název)	Zkratka	t_R (min)	λ_{max} (nm)	MS/MS ² (m/z)
<i>Deriváty benzoové kyseliny</i>				
Benzoová kyselina	BA	9,4	229/273	121
2-Hydroxybenzoová kyselina (salicylová kyselina)	2-HBA	13,3	236/299	137/93
3-Hydroxybenzoová kyselina	3-HBA	4,6	204/235/296	137/93
4-Hydroxybenzoová kyselina	4-HBA	3,4	193/255	137/93
2,3-Dihydroxybenzoová kyselina	2,3-DHBA	6,9	208/245/323	153, 167, 169
3,4-Dihydroxybenzoová kyselina (protokatechová kyselina)	3,4-DHBA	2,2	203/259/293	153/109
2,5-Dihydroxybenzoová kyselina (gentisová kyselina)	2,5-DHBA	6,6	209/246/322	153/109
3,4,5-Trihydroxybenzoová kyselina (galová kyselina)	3,4,5-THBA	1,6	202/213/277/3 12	169
4-Hydroxy-3-methoxybenzoová kyselina (vanilová kyselina)	4-HMBA	3,8	203/216/260/2 91	167/152, 123
4-Hydroxy- 3,5- dimethoxybenzoová kyselina (Syringová kyselina)	4-HDMBA	3,9	215/274	197
<i>Hydroxyderiváty fenylactové kyseliny</i>				
Fenylactová kyselina	PA	9,8	205/257	135
2-Hydroxyfenylactová kyselina	2-HPA	6,1	216/273	151/107
3-Hydroxyfenylactová kyselina	3-HPA	4,5	218/274	151/107
4-Hydroxyfenylactová kyselina	4-HPA	3,5	220/275	151/107
3,4-Dihydroxyfenylactová kyselina	3,4-DHPA	2,4	195/282	167/123
4-Hydroxy-3-methoxy- fenylactová kyselina (homovanilová kyselina)	4-HMPA	4,0	197/227/280	181/137
<i>Hydroxyderiváty fenylpropionové kyseliny</i>				
2-Hydroxyfenylpropionová kyselina	2-HPPA	9,1	216/273	165/147,121
3-Hydroxyfenylpropionová kyselina	3-HPPA	5,6	206/251	165/165
4-Hydroxyfenylpropionová	4-HPPA	5,7	220/277	165/121

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Sloučenina (triviální název)	Zkratka	t_R (min)	$\lambda_{\max}$ (nm)	MS/MS ² (m/z)
kyselina (floreťová kyselina)				
3,4-Dihydroxyfenylpropionová kyselina (Dihydrocaffeová kyselina)	3,4-DHPPA	3,3	195/279	181/137
4-Hydroxy-3- methoxyfenylpropionová kyselina (dihydroferulová kyselina)	4-HMPPA	6,4	197/227/280	195
<i>Hydroxyderiváty skořicové kyseliny</i>				
Skořicová kyselina	CA	14,6	223/276	147
3-Hydroxyskořicová kyselina	3-HCA	8,8	232/277	163/119
4-Hydroxyskořicová kyselina (p-Coumarová kyselina)	4-HCA	6,9	225/309	163/119
3,4-Dihydroxyskořicová kyselina (Caffeová kyselina)	3,4-DHCA	3,9	218/247/320	179
3-Hydroxy-4-methoxyskořicová kyselina (Isoferulová kyselina)	3-HMCA	8,4	240/297/322	193/178
4-Hydroxy-3-methoxyskořicová kyselina (Ferulová kyselina)	4-HMCA	7,8	237/321	193/149, 178, 134
4-Hydroxy-3,5- dimethoxyskořicová kyselina (Sinapová kyselina)	4-HDMCA	7,7	235/323	223
<i>(Hydroxy)hippurová kyselina/jiné</i>				
Hippurová kyselina	HA	5,2	192/227	178/134
2-Hydroxyhippurová kyselina	2-HHA	8,1	202/238/299	194
Chlorogenová kyselina	CGA	3,9	215/249/322	353
Rozmarýnová kyselina	RA	12,9	248/326	359
Elagová kyselina	EA	8,9	251	301
Kvercetin	QU	14,9	255/296/368	301
Katechin	CT	2,8	202/228/278	289
Rutin	RU	8,18	210/227/256/3 54	609

5 Výsledky

5.1 Výsledky zpracování extraktů a frakcí a jejich hodnocení

5.1.1 Výtěžky ethanolových extrakcí a přípravy fenolové frakce

Extrakty z 50 g lyofilizovaných plodů *L. caerulea* L., označené jako E1 – E4, byly vakuově odpařeny s výtěžkem uvedeným v Tab. 15.

Tab. 15: Výtěžky jednotlivých extrakčních porcí ethanolové extrakce plodů *L. caerulea* L.

Označení extraktu	Objem extrakčního činidla (ml)	Objem slitého extraktu (ml)	Hmotnost medovitého odparku (g)
E1	500	345	18,2
E2	300	340	12,3
E3	200	248	4,9
E4	200	195	0,7

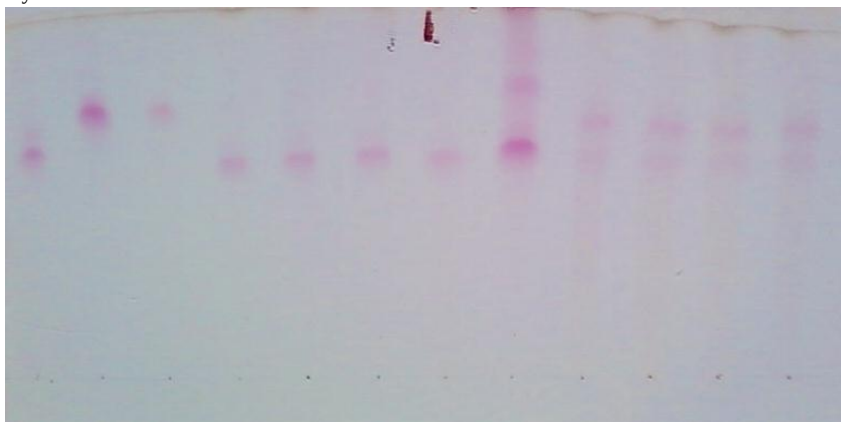
Výtěžek extraktu P při navážce 50,3 g lyofilizovaných plodů *L. caerulea* L. byl 29,7 g lyofilizátu a extraktu L při stejné navážce 27,2 g lyofilizátu.

Eluát z přípravy fenolové frakce *L. caerulea* L. při navážce 5 kg mražených plodů byl vakuově odpařen, a tím bylo získáno 19,27 g medovitého odparku.

5.1.2 HPTLC stanovení anthokyaninů

Kvalitativní analýza fenolových látek byla provedena vysokoúčinnou chromatografií na tenké vrstvě (HPTLC; Obr. 9). Srovnáním se standardy byl potvrzen nejvyšší obsah anthokyaninů (především kyanidin-3-glukosidu) ve fenolové frakci *L. caerulea* L. oproti extraktům E1 - E4. Pro srovnání jsou znázorněny i výsledky vzorků tablet s obsahem extraktu *V. macrocarpon* Ait. ze SS č. 347 a 349 v časech T0 a T4.

Kya Peo Pel E1 E2 E3 E4 PF S1 S2 S3 S4



Obr. 9: HPTLC deska se srovnáním různých extraktů a frakce *L. caerulea* L. a tablet s extraktem *V. macrocarpon* Ait. (Kya ... Kyanidin-3-glukosid; Peo ... peonidin-3-glukosid; Pel ... pelargonidin-3-glukosid; koncentrace standardů 0,4 mg/l, nanášeno 2,5 µl; E1 ... celý lyofilizovaný plod, 2 ... fenolová frakce *L.c.*, 3 ... frakce 8/1, 4 ... frakce 8/2, PF ... fenolová frakce *L. caerulea* L.; S1 ... tablety ze SS č. 347 z času T0; S2 ... tablety ze SS č. 349 z času T0; S3 ... tablety ze SS č. 347 v čase T4; S4 ... tablety ze SS č. 349 v čase T4; koncentrace všech vzorků tablet 25 mg/l methanolu, nanášeno 10 µl. Mobilní fáze A: HCl/CH₃COOH/H₂O, 3:15:82; Mobilní fáze B: H₂O/CH₃COOH, 4:6

5.1.3 Srovnání extraktů s různými podmínkami extrakce

Lyofilizáty extraktů *L. caerulea* L. „P“ a „L“ byly podrobeny testům antioxidační aktivity na zhášení DPPH a stanovením redukční kapacity pomocí Folin-Ciocalteuova činidla. Dále byla stanovena cytotoxicita na primárních kulturách endotelových buněk.

5.1.3.1 Stanovení obsahových látek

Stanovení obsahu fenolových kyselin, flavonoidů (Tab. 16) a anthokyaninů (Tab. 17) bylo provedeno analýzou LC/MS. Dominantním anthokyaninem byl kyanidin-3-glukosid, což potvrzuje kvalitativní HPTLC analýzu. Nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly v celkovém množství fenolových kyselin, flavonoidů a anthokyaninů.

Tab. 16: Obsah fenolových kyselin a flavonoidů v extraktech L a P, jejich absolutní a relativní množství

Fenolové kyseliny	L (mg/g)	L (rel.%)	P (mg/g)	P (rel.%)
Gentisová	0,042 ± 0,0001	3,2	0,042 ± 0,00002	3,8
p-Kumarová	0,0038 ± 0,0001	0,3	0,0048 ± 0,0003	0,4
Ferulová	0,018 ± 0,003	1,4	0,015 ± 0,001	1,4
Chlorogenová	1,18 ± 0,13	90,3	0,83 ± 0,06	94,3
Rozmarýnová	0,063 ± 0,001	4,8	-	
celkem	1,31 ± 0,20	100	1,09 ± 0,06	100
Flavonoidy				
Kvercetin	2,74 ± 1,29	74,6	3,46 ± 0,083	81,7
Rutin	0,93 ± 0,04	25,4	0,78 ± 0,01	18,3
celkem	3,67 ± 1,32	100	4,23 ± 0,09	100

Tab. 17: Obsah anthokyaninů v extraktech L a P, jejich absolutní a relativní množství

Anthokyaniny	L (mg/g)	L (rel.%)	P (mg/g)	P (rel.%)
Kyanidin	0,29 ± 0,09	1,1	0,33 ± 0,12	1,2
Kya-3-ara	0,24 ± 0,04	0,9	-	-
Kya-3-glu	12,61 ± 0,07	46,9	13,84 ± 0,09	49,3
Kya-3-rut	1,26 ± 0,03	4,7	1,13 ± 0,13	4,0
Kya-3,5-diglu	0,73 ± 0,01	2,7	0,72 ± 0,03	2,6
Delfinidin	0,91 ± 0,08	3,4	0,46 ± 0,003	1,7
Del-3-glu	0,53 ± 0,01	2,0	0,72 ± 0,02	2,6
Def-3-rut	4,41 ± 0,06	16,4	4,44 ± 0,18	15,8
Pelar-3-glu	0,81 ± 0,06	3,1	1,04 ± 0,14	3,7
Peo-3-glu	12,96 ± 0,03	11,0	13,84 ± 0,09	10,4
Peo-3-rut	0,55 ± 0,06	2,0	0,58 ± 0,02	2,0
Peo-3,5-diglu	0,44 ± 0,07	1,7	0,91 ± 0,12	3,3
Petunidin-3-rut	1,12 ± 0,06	4,2	0,97 ± 0,13	3,5
celkem	26,9 ± 0,7	100	28,1 ± 1,0	100

5.1.3.2 Zhášení DPPH radikálu

Výsledek byl vyjádřen jako koncentrace testované látky, která způsobila 50% pokles absorbance reakční směsi při vlnové délce 517 nm (IC₅₀). Výsledky získané při sledování

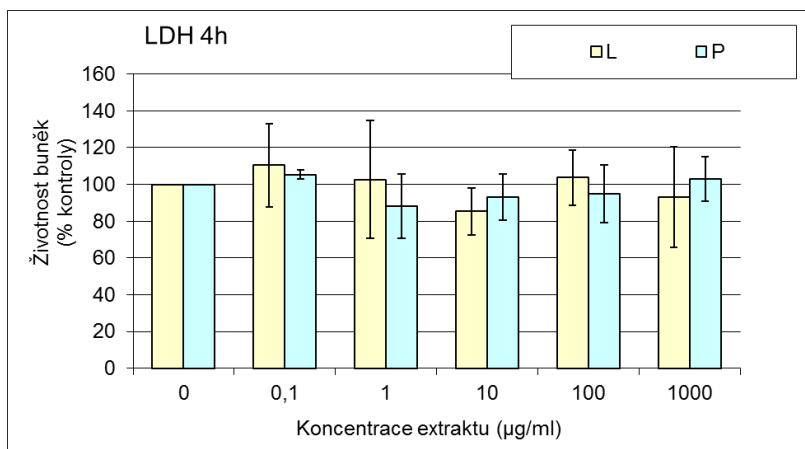
zhášení DPPH radikálu ukazují na statisticky nevýznamný rozdíl v antioxidační aktivitě obou extraktů (IC_{50} pro extrakt L byla stanovena na 477,8 ($\pm 67,9$) $\mu\text{g/ml}$ a pro extrakt P 478,3 ($\pm 81,03$) $\mu\text{g/ml}$).

5.1.3.3 Stanovení redukční kapacity

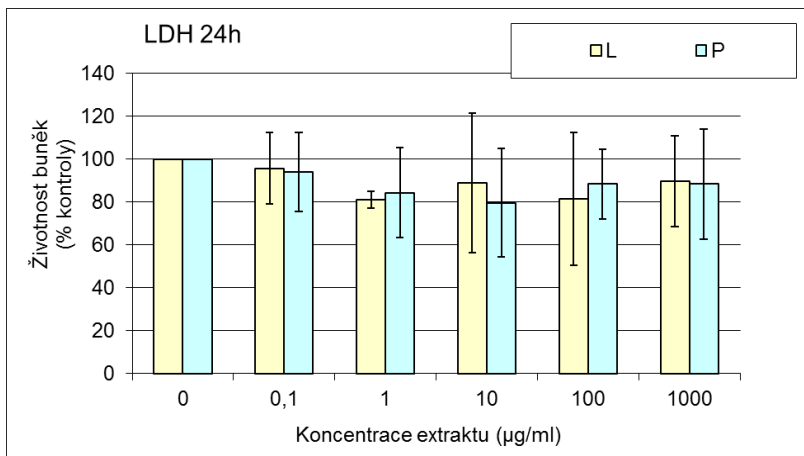
Redukční kapacita vypočtená z kalibrační křivky galové kyseliny je v extraktu L 3,54% ($\pm 0,33$) a v extraktu P 2,93% ($\pm 0,77$) GAE. Rozdíl není statisticky významný. Odpovídá to 1911 mg GAE/100 mg, resp. 1728 mg GAE/100 mg lyofilizovaných plodů.

5.1.3.4 Stanovení cytotoxicity

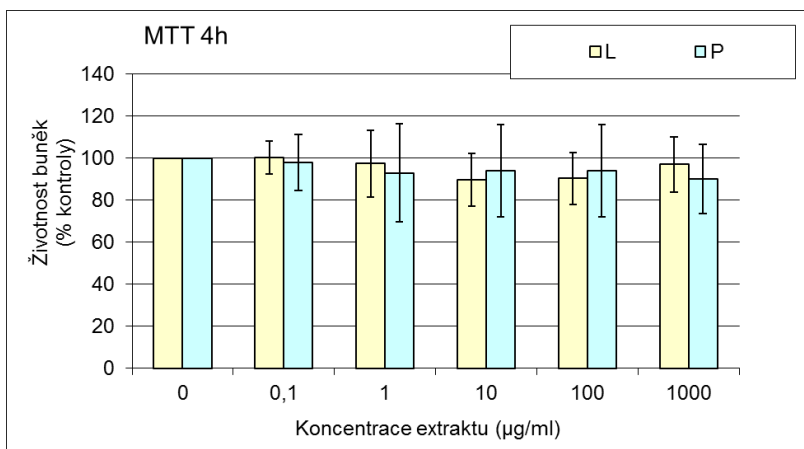
Vliv extraktů na životnost buněčné kultury byl sledován na modelu primárních kultur lidských endotelových buněk v koncentračním rozmezí 0-1000 $\mu\text{g/l}$ po 4 a 24 hodinách. Kvalita kultury byla hodnocena LDH, MTT a TBARS testem. Výsledky byly pro větší přehlednost vyjádřeny jako životnost buněk (%) ve srovnání s kontrolní kulturou, která byla inkubována stanovenou dobu v médiu bez testovaných látek. Testované extrakty P a L nebyly v testovaných koncentracích cytotoxické, ani nebyl žádný statisticky významný rozdíl mezi oběma extrakty (Obr. 10 - Obr. 15).



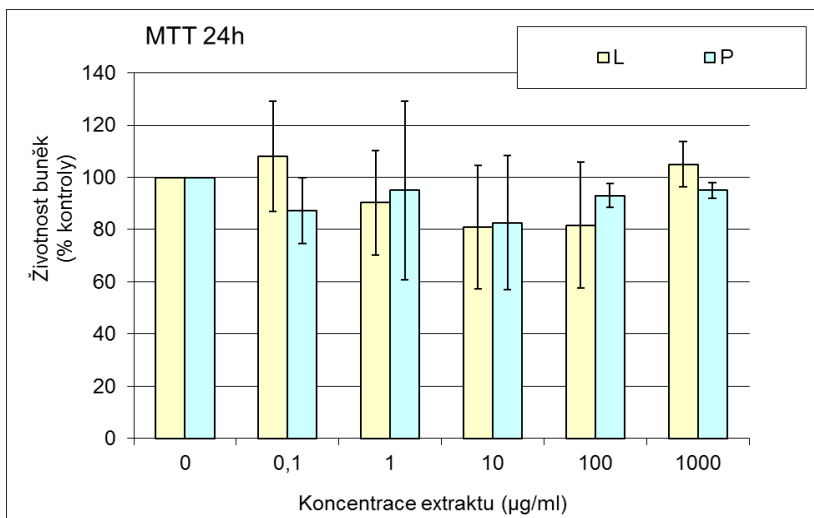
Obr. 10: Vliv extraktů *L. caerulea* L., L a P, v koncentracích 0-1000 $\mu\text{g/l}$ na životnost HUVEC, měřená testem LDH po 4 hod. Hodnoty jsou průměrem $\pm$ SD ze dvou měření provedených v tripletu.



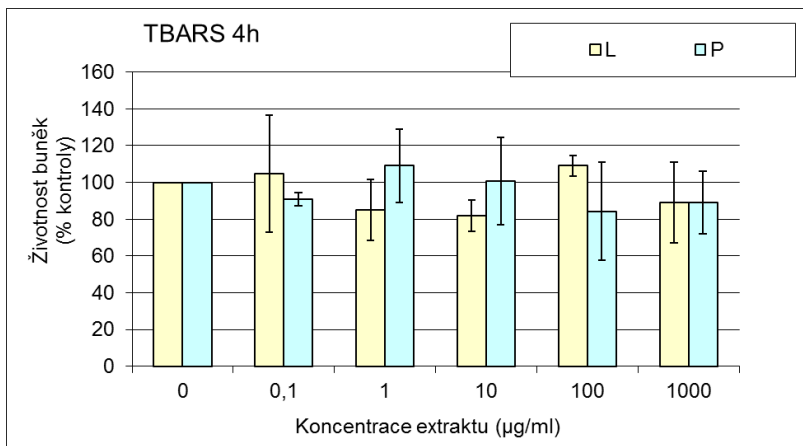
Obr. 11: Vliv extraktů *L. caerulea* L., L a P, v koncentracích 0-1000 µg/l na životnost HUVEC, měřená testem LDH po 24 hod. Hodnoty jsou průměrem ± SD ze dvou měření provedených v triplictu.



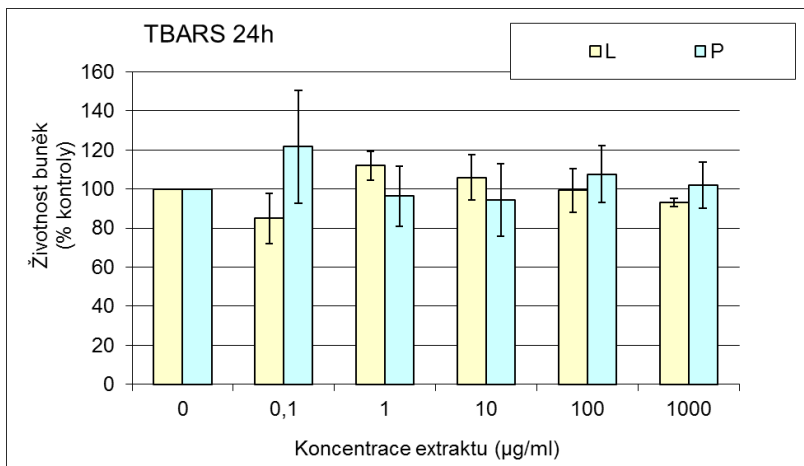
Obr. 12: Vliv extraktů *L. caerulea* L., L a P, v koncentracích 0-1000 µg/l na životnost HUVEC, měřená testem MTT po 4 hod. Hodnoty jsou průměrem ± SD ze dvou měření provedených v triplictu.



Obr. 13: Vliv extraktů *L. caerulea* L., L a P, v koncentracích 0-1000 µg/l na životnost HUVEC, měřená testem MTT po 24 hod. Hodnoty jsou průměrem ± SD ze dvou měření provedených v tripletu.



Obr. 14: Vliv extraktů *L. caerulea* L., L a P, v koncentracích 0-1000 µg/l na životnost HUVEC, měřená testem TBARS po 4 hod. Hodnoty jsou průměrem ± SD ze dvou měření provedených v tripletu.



Obr. 15: Vliv extraktů *L. caerulea* L., L a P, v koncentracích 0-1000 µg/l na životnost HUVEC, měřena testem TBARS po 24 hod. Hodnoty jsou průměrem ± SD ze dvou měření provedených v tripletu.

5.2 Stabilitní studie

5.2.1 Výsledky fyzikálně-chemických a mikrobiologických atributů

Fyzikální, chemické i mikrobiologické atributy byly u všech testovaných přípravků až na výjimky vyhovující. U všech provedených testů a přípravků byly vyhovující tvar, barva, výška tablety, průměrná hmotnost a pevnost tablet. V případě tablet LONICERA, studie č. 537 (střednědobá stabilitní studie), 542 (dlouhodobá stabilitní studie) a 543 (střednědobá stabilitní studie) došlo po 12, resp. po 9 a 6 měsících k popraskání všech testovaných tablet (nevýhovující forma tablet). V případě studie č. 579 (dlouhodobá stabilitní studie tablet DENOXINAL NEW) byla v čase T0 (na začátku studie) zmeřena nadlimitní rozpadavost tablet (32,02 minut, limit byl 30 minut).

V následujících tabulkách jsou přehledně uspořádány výsledky fyzikálně-chemických a mikrobiologických atributů dle čísla studie (Tab. 18 - Tab. 29).

Tab. 18: Výsledky krátkodobé stabilitní studie Urinal Akut č. 346

Parametr	Limit	Jednotka	Perioda testování (měsíc)		
			0	3	6
Barva	Fialová	---	VYH	VYH	VYH
Tvar	Protáhlá tableta, bikonvexní	---	VYH	VYH	VYH
Forma	Tableta	---	VYH	VYH	VYH
Výška tablety	4,9 – 5,7	mm	5,53	5,60	5,84
Pevnost tablet	Min. 170	N	330	Nad 500	Nad 500
Průměrná hmotnost tablety	808 – 892	mg	850,7	872,9	890,3
Rozpadavost	Max. 30	min	26,97	34,60	37,10
Obsah vody	---	%	4,29	5,16	5,04
Bakterie	Max. 10^4	CFU / g	25	30	25
Houby	Max. 10^2	CFU / g	NEZ	NEZ	NEZ
<i>Enterobakterie</i> a jiné G-	Max. 10^2	CFU / g	NEZ	NEZ	NEZ
<i>Salmonella</i>	NEG / 10 g		NEG	NEG	NEG
<i>Staphylococcus aureus</i>	NEG / 1 g		NEG	NEG	NEG
<i>E.coli</i>	NEG / 1 g		NEG	NEG	NEG

Pozn.: VYH ... vyhovuje; NEZ ... nezjištěno; NEG ... negativní

Tab. 19: Výsledky dlouhodobé stabilitní studie Urinal Akut č. 347

Parametr	Limit	Jednotka	Perioda testování (měsíc)						
			0	3	6	9	12	18	24
Barva	Fialová	---	VYH	VYH	VYH	VYH	VYH	VYH	VYH
Tvar	Protáhlá tableta, bikonvexní	---	VYH	VYH	VYH	VYH	VYH	VYH	VYH
Forma	Tableta	---	VYH	VYH	VYH	VYH	VYH	VYH	VYH
Výška tablety	4,9 – 5,7	mm	5,53	5,56	5,54	5,57	5,57	5,58	5,61
Pevnost tablet	Min. 170	N	330	358	416	>500	>500	>500	>500
Průměrná hmotnost tablety	808 – 892	mg	850,7	860,8	859,9	868,4	873,0	882,7	884,8
Rozpadavost	Max. 30	min	26,97	32,03	29,05	30,37	36,98	33,60	28,22
Obsah vody	---	%	4,29	5,13	6,14	6,07	5,94	6,24	5,96
Bakterie	Max. 10 ⁴	CFU / g	25	125	50	2350	70	50	40
Houby	Max. 10 ²	CFU / g	NEZ	NEZ	NEZ	NEZ	NEZ	NEZ	NEZ
<i>Enterobakterie</i> a jiné G-	Max. 10 ²	CFU / g	NEZ	NEZ	NEZ	NEZ	NEZ	NEZ	NEZ
<i>Salmonella</i>	NEG/ 10 g		NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
<i>Staphylococcus aureus</i>	NEG / 1 g		NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
<i>E. coli</i>	NEG / 1 g		NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

Pozn.: VYH ... vyhovuje; NEZ ... nezjištěno; NEG ... negativní

Tab. 20: Výsledky studie krátkodobé stabilitní studie Urinal Akut č. 348

Parametr	Limit	Jednotka	Perioda testování (měsíc)		
			0	3	6
Barva	Fialová	---	VYH	VYH	VYH
Tvar	Protáhlá tableta, bikonvexní	---	VYH	VYH	VYH
Forma	Tableta	---	VYH	VYH	VYH
Výška tablety	4,9 – 5,7	mm	5,51	5,60	5,85
Pevnost tablet	Min. 170	N	370	Nad 500	--- ¹⁾
Průměrná hmotnost tablety	808 – 892	mg	851,3	876,7	889,4
Rozpadavost	Max. 30	min	28,67	33,95	42,20
Obsah vody	---	%	4,85	5,15	5,83
Bakterie	Max. 10 ⁴	CFU / g	5	45	20
Houby	Max. 10 ²	CFU / g	NEZ	NEZ	NEZ
<i>Enterobakterie</i> a jiné G-	Max. 10 ²	CFU / g	NEZ	NEZ	NEZ
<i>Salmonella</i>	NEG / 10 g		NEG	NEG	NEG
<i>Staphylococcus aureus</i>	NEG / 1 g		NEG	NEG	NEG
<i>E.coli</i>	NEG / 1 g		NEG	NEG	NEG

Pozn.: VYH ... vyhovuje; NEZ ... nezjištěno; NEG ... negativní

Tab. 21: Výsledky dlouhodobé stabilitní studie Urinal Akut č. 349

Parametr	Limit	Jednotka	Perioda testování (měsíc)						
			0	3	6	9	12	18	24
Barva	Fialová	---	VYH	VYH	VYH	VYH	VYH	VYH	VYH
Tvar	Protáhlá tableta, bikonvexní	---	VYH	VYH	VYH	VYH	VYH	VYH	VYH
Forma	Tableta	---	VYH	VYH	VYH	VYH	VYH	VYH	VYH
Výška tablety	4,9 – 5,7	mm	5,51	5,55	5,54	5,55	5,57	5,57	5,61
Pevnost tablet	Min. 170	N	370	416	478	>500	>500	>500	>500
Průměrná hmotnost tablety	808 – 892	mg	851,3	864,2	868,9	872,3	876,1	879,9	887,5
Rozpadavost	Max. 30	min	28,67	33,22	29,88	32,70	43,43	35,32	25,00
Obsah vody	---	%	4,85	5,38	6,47	5,98	5,36	5,31	5,82
Bakterie	Max. 104	CFU / g	5	40	75	3405	70	50	10
Houby	Max. 102	CFU / g	NEZ	NEZ	NEZ	50	NEZ	NEZ	NEZ
<i>Enterobakterie</i> a jiné G-	Max. 102	CFU / g	NEZ	NEZ	NEZ	NEZ	NEZ	NEZ	NEZ
<i>Salmonella</i>	NEG/ 10 g		NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
<i>Staphylococcus aureus</i>	NEG / 1 g		NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
<i>E.coli</i>	NEG / 1 g		NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

Pozn.: VYH ... vyhovuje; NEZ ... nezjištěno; NEG ... negativní

Tab. 22: Výsledky krátkodobé stabilitní studie Lonicer a č. 536

Parametr	Limit	Jednotka	Perioda testování (měsíc)						
			0	3	6	9	12	18	24
Barva	Fialová	---	VYH	VYH	VYH	VYH	VYH	VYH	VYH
Tvar	Protáhlá tableta, bikonvexní	---	VYH	VYH	VYH	VYH	VYH	VYH	NEV ¹⁾
Forma	Tableta	---	VYH	VYH	VYH	VYH	VYH	VYH	VYH
Výška tablety	4,9 – 5,7	mm	5,43	5,46	5,47	5,50	5,52	5,63	5,91
Pevnost tablet	Min. 170	N	413	406	296	335	279	207	110
Průměrná hmotnost tablety	808 – 892	mg	850,3	855,4	856,2	857,4	860,8	866,2	866,8
Rozpadavost	Max. 30	min	17,02	13,80	14,30	14,02	14,75	15,88	14,7
Obsah vody	---	%	3,75	3,50	---	---	4,36	---	5,54

Pozn.: VYH ... vyhovuje; NEV ... nevyhovuje

Tab. 23: Výsledky střednědobé stabilitní studie Lonicer a č. 537

Parametr	Limit	Jednotka	Perioda testování (měsíc)				
			0	3	6	9	12
Barva	Fialová	---	VYH	VYH	VYH	VYH	VYH
Tvar	Protáhlá, bikonvexní	---	VYH	VYH	VYH	VYH	VYH
Forma	Tableta	---	VYH	VYH	VYH	VYH	NEV ¹⁾
Výška tablety	---	mm	5,43	5,48	5,57	5,80	---
Pevnost tablet	---	N	413	355	252	180	---
Průměrná hmotnost tablety	---	mg	850,3	859,0	861,4	864,9	---
Rozpadavost	Max. 30	min	17,02	14,98	19,20	20,32	---
Obsah vody	---	%	3,75	3,35	---	---	---

Pozn.: VYH ... vyhovuje; NEV ... nevyhovuje

¹⁾ došlo k popraskání všech tablet

Tab. 24: Výsledky krátkodobé stabilitní studie Lonicera č. 542

Parametr	Limit	Jednotka	Perioda testování (měsíc)			
			0	3	6	9
Forma	Potahovaná tableta	---	VYH	VYH	VYH	NEV ¹⁾
Tvar	Tablety protáhlé, bikonvexní	---	VYH	VYH	VYH	VYH
Barva	Fialová	---	VYH	VYH	VYH	VYH
Výška tablety	---	mm	5,47	5,48	5,56	---
Průměrná hmotnost tablety	---	mg	852,0	859,3	866,6	---
Pevnost tablet	---	N	373	267	179	---
Rozpadavost tablet	Max. 30	min	13,60	18,08	14,72	---
Obsah vody	---	%	3,52	3,71	---	---

Pozn.: VYH ... vyhovuje; NEV ... nevyhovuje

¹⁾ Došlo k popraskání všech tablet

Tab. 25: Výsledky střednědobé stabilitní studie Lonicera č. 543

Parametr	Limit	Jednotka	Perioda testování (měsíc)		
			0	3	6
Forma	Potahovaná tableta	---	VYH	VYH	NEV ¹⁾
Tvar	Tablety protáhlé, bikonvexní	---	VYH	VYH	VYH
Barva	Fialová	---	VYH	VYH	VYH
Výška tablety	---	mm	5,47	5,59	---
Průměrná hmotnost tablety	---	mg	852,0	863,2	---
Pevnost tablet	---	N	373	229	---
Rozpadavost tablet	Max. 30	min	13,60	17,30	---
Obsah vody	---	%	3,52	3,50	---

Pozn.: VYH ... vyhovuje; NEV ... nevyhovuje

¹⁾ Došlo k popraskání všech tablet

Tab. 26: Výsledky dlouhodobé stabilitní studie Denoxinal New č. 579

Parametr	Limit	Jednotka	Perioda testování (měsíc)			
			0	3	6	9
Forma	Potahovaná tableta	---	VYH	VYH	VYH	VYH
Tvar	Tablety protáhlé, bikonvexní	---	VYH	VYH	VYH	VYH
Barva	Zelená	---	VYH	VYH	VYH	VYH
Výška tablety	---	mm	6,14	6,21	6,18	6,18
Průměrná hmotnost tablety	---	mg	995,4	1001,1	1005,0	1005,2
Pevnost tablet	---	N	260	258	265	268
Rozpadavost tablet	Max. 30	min	32,02*	11,48	10,00	9,48
Obsah vody	---	%	3,74	---	---	---

Pozn.: VYH ... vyhovuje

* Hodnoty jsou nad limitem.

Tab. 27: Výsledky střednědobé stabilitní studie Denoxinal New č. 580

Parametr	Limit	Jednotka	Perioda testování (měsíc)			
			0	3	6	9
Forma	Potahovaná tableta	---	VYH	VYH	VYH	VYH
Tvar	Tablety protáhlé, bikonvexní	---	VYH	VYH	VYH	VYH
Barva	Zelená	---	VYH	VYH	VYH	VYH
Výška tablety	---	mm	6,14	6,18	6,22	6,28
Průměrná hmotnost tablety	---	mg	995,4	998,2	1009,4	1019,0
Pevnost tablet	---	N	260	259	304	332
Rozpadavost tablet	Max. 30	min	32,02	14,23	13,13	10,95
Obsah vody	---	%	3,74	---	---	---

Pozn.: VYH ... vyhovuje

Tab. 28: Výsledky dlouhodobé stabilitní studie Urinal New č. 638

Parametr	Limit	Jednotka	Perioda testování (měsíc)	
			0	3
Forma	Potahovaná tableta	---	VYH	VYH
Tvar	Tablety kulaté, bikonvexní	---	VYH	VYH
Barva	Fialová	---	VYH	VYH
Výška tablety	---	mm	5,23	5,26
Průměrná hmotnost tablety	---	mg	551,0	554,2
Pevnost tablet	---	N	162	165
Rozpadavost tablet	Max. 30	min	14,52	16,35
Ztráta sušením	---	%	1,93	2,83

Pozn.: VYH ... vyhovuje

Tab. 29: Výsledky střednědobé stabilitní studie Urinal New č. 639

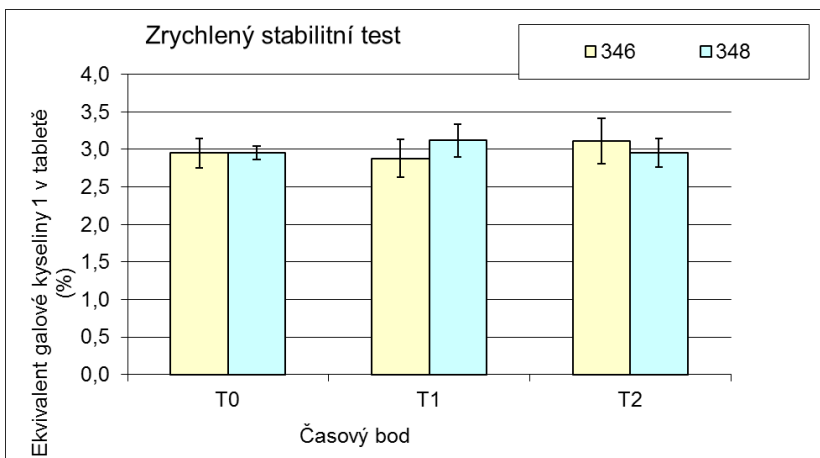
Parametr	Limit	Jednotka	Perioda testování (měsíc)	
			0	3
Forma	Potahovaná tableta	---	VYH	VYH
Tvar	Tablety kulaté, bikonvexní	---	VYH	VYH
Barva	Fialová	---	VYH	VYH
Výška tablety	---	mm	5,23	5,25
Průměrná hmotnost tablety	---	mg	551,0	554,6
Pevnost tablet	---	N	162	158
Rozpadavost tablet	Max. 30	min	14,52	18,05
Ztráta sušením	---	%	1,93	2,99

Pozn.: VYH ... vyhovuje

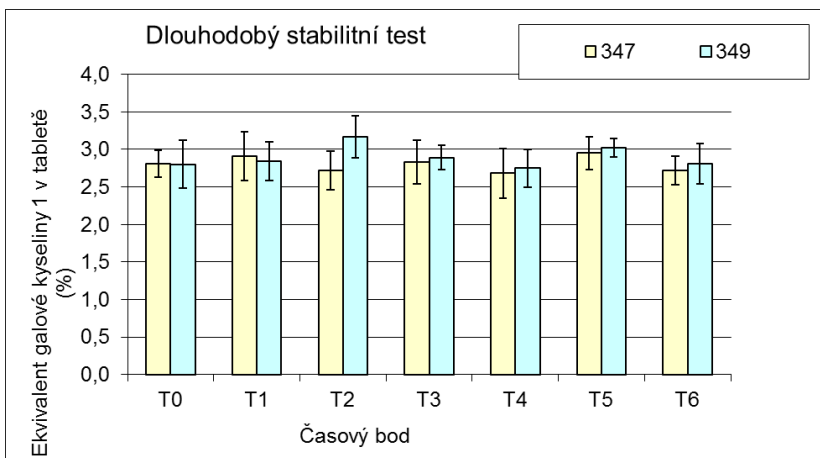
5.2.2 Výsledky stanovení redukční kapacity

Výsledky stanovení redukční kapacity pomocí Folin-Ciocalteuova fenolového činidla (ekvivalent galové kyseliny v % v tabletech Urinal Akut) ve zrychleném a dlouhodobém stabilitním testu jsou znázorněny v grafech (Obr. 16 a Obr. 17). Ve stabilitní studii

nedocházelo v jednotlivých časových bodech k významným statistickým změnám redukční kapacity v hodnotách GAE.



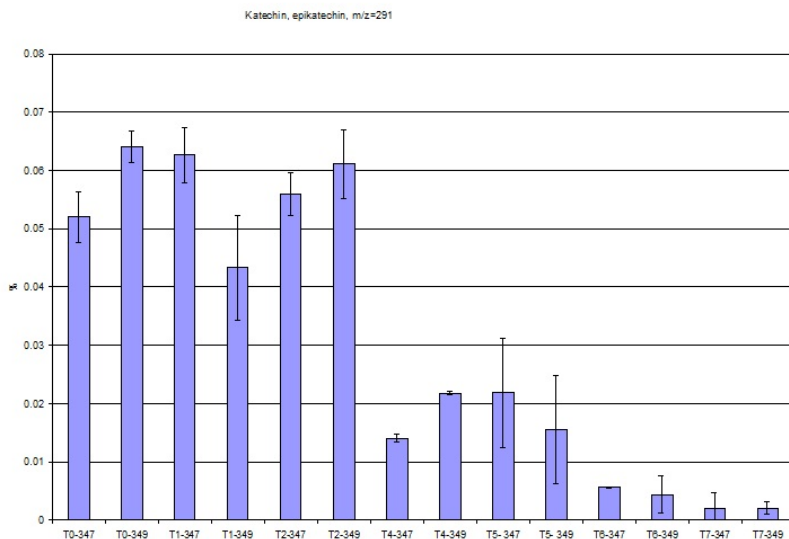
Obr. 16: Redukční kapacita ve zrychlené SS č. 346 a 348



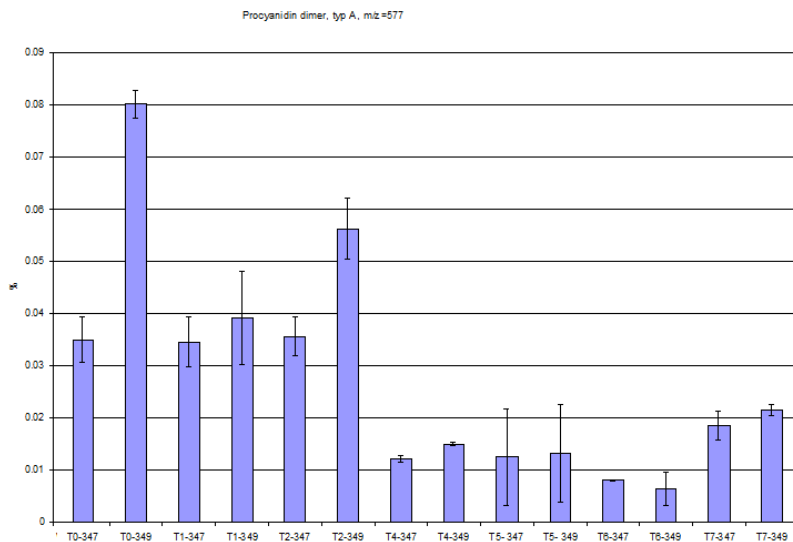
Obr. 17: Redukční kapacita v dlouhodobé SS č. 347 a 349

5.2.3 Výsledky stanovení prokyanidinů

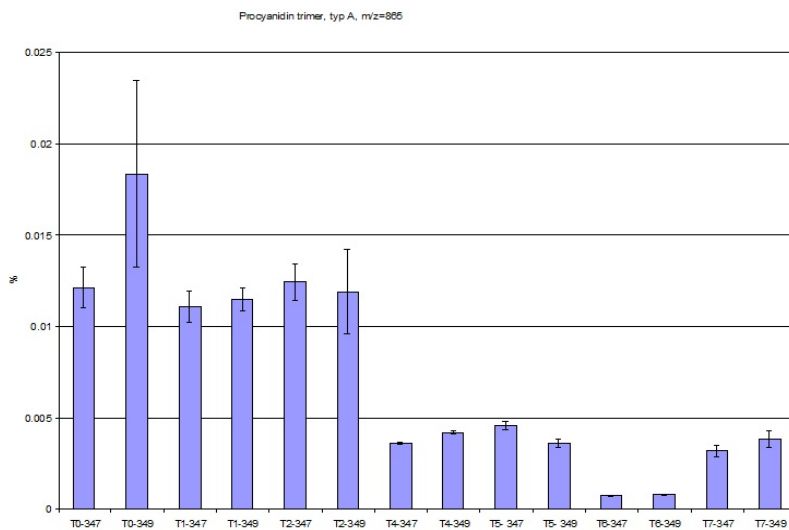
Ve všech vzorcích ze SS č. 347-349 (v časech T0 - T7) byly nalezeny a kolizními spektry jednoznačně potvrzeny proanthokyanidiny (PA) typu A: monomer, dimer, trimer i tetramer. Během studie docházelo ke snižování obsahů všech sledovaných proanthokyanidinů a prezentované grafy (Obr. 18 - Obr. 23) demonstrují průběh změn v obsahu PA v závislosti na čase. Bylo zjištěno, že dochází ke snížení sumy obsahu epikatechin – dimer – trimetr - tetramer přibližně o 60 % oproti odběru v čase T5. Největší pokles byl zaznamenán u trimerního PA-typu A, shodně u obou vzorků – T6-347 i T6-349. Analýzou odběru T7 byly nalezeny mírně vyšší obsahy dimeru, trimerního a sumy všech proanthokyanidinů ve srovnání s odběrem v čase T6. Rozdíly oproti odběru v čase T5 jsou v rámci konfidenčních intervalů a nejsou tedy statisticky významné. Mírně zvýšený obsah oproti předchozím třem odběrům byl pozorován u tetramerního (přibližně odpovídá polovině původního množství v čase T0). Obsah epikatechinu klesl na hodnotu menší než 5 % původního množství (oproti odběru v čase T0).



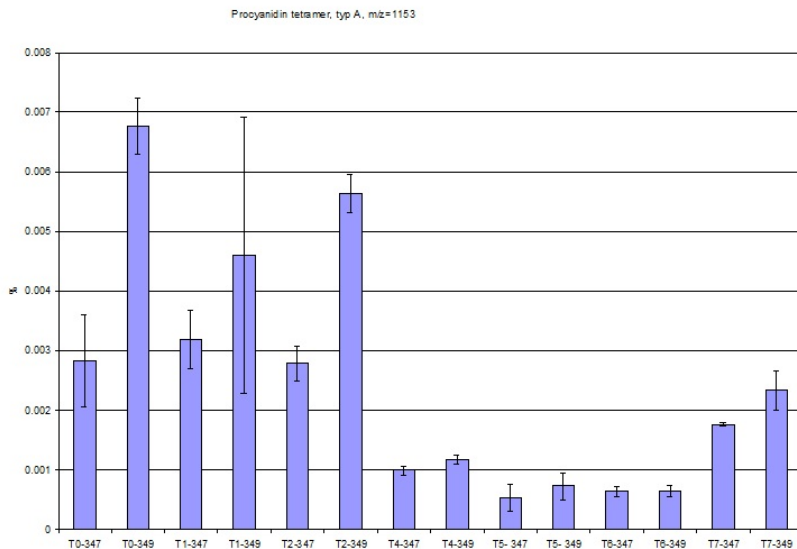
Obr. 18: Analyzované změny v obsahu prokyanidinu typu A ve SS č. 347 a 349 - katechin (monomer), m/z=291



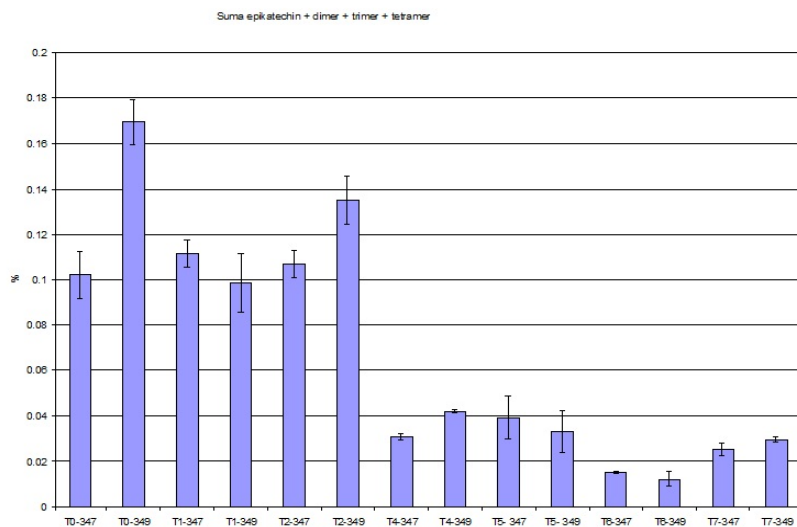
Obr. 19: Analyzované změny v obsahu prokyanidinu typu A ve SS č. 347 a 349 - proanthokyanidin, dimer, typ A, m/z=577



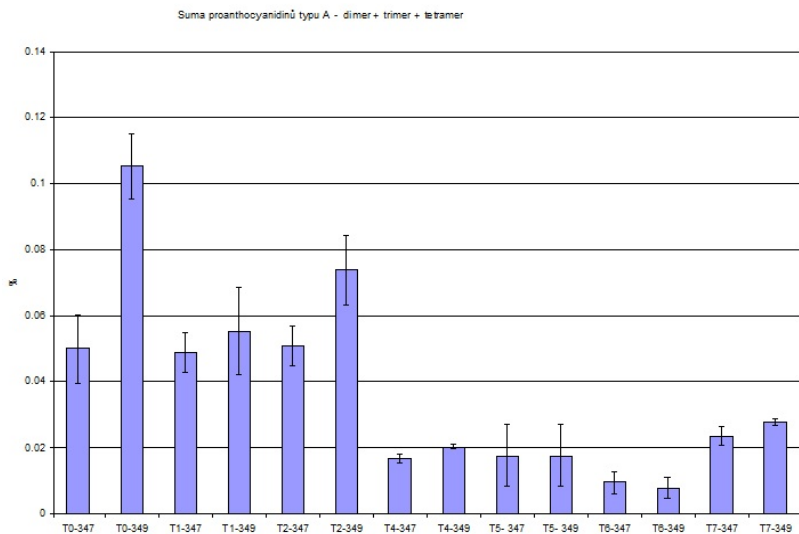
Obr. 20: Analyzované změny v obsahu prokyanidinu typu A ve SS č. 347 a 349 - proanthokyanidin, trimer, typ A, m/z=867



Obr. 21: Analyzované změny v obsahu prokyanidinu typu A ve SS č. 347 a 349 - proanthokyanidin, tetramer, typ A, m/z=1153



Obr. 22: Analyzované změny v obsahu prokyanidinu typu A ve SS č. 347 a 349 - suma proanthokyanidinů, monomer-tetramer, typ A



Obr. 23: Analyzované změny v obsahu prokyanidinu typu A ve SS č. 347 a 349 - suma proanthocyanidinů, dimer-tetramer, typ A

5.3 Výsledky intervenční studie

Stav základních biochemických a jiných parametrů na začátku studie je uveden v Tab. 30. Během studie nedošlo k výskytu žádných nežádoucích reakcí u dobrovolníků. Nebyla zaznamenána žádná významná změna hlavních biochemických nebo hematologických parametrů, ani nedošlo ke změně krevního tlaku. Celková antioxidační kapacita plazmy nebyla intervencí ovlivněna. Došlo ale k významnému zvýšení GPx, katalasy (Obr. 24) a hodnot TBARS v erythrocytech. V plazmě došlo naopak ke snížení TBARS a ke statisticky nevýznamnému snížení AOPP ($p = 0,084$) a oxidovaného LDL (OxLDL) ($p = 0,164$) (Tab. 31, Obr. 26).

Tab. 30: Biochemické a jiné parametry u dobrovolníků na začátku studie

Věk (roky; min.-max.)	25-39		
Pohlaví (muži/ženy)	2/8		
	1 st kvartil	median	3 rd kvartil
BMI (kg/m ²)	21,8	23,0	24,3
Systolický krevní tlak (mmHg)	109,5	119,5	123,3
Diastolický krevní tlak (mmHg)	73,3	74,0	78,5
Srdeční tep (min ⁻¹)	67,5	71,5	74,0
TAC (mmol/l)	1,84	1,87	1,89

VÝSLEDKY

Močovina (mmol/l)	3,8	4,35	4,57
Kreatinin (μmol/l)	63,0	64,5	73,5
Bilirubin (μmol/l)	7,5	10,5	12,0
ALT (μkat/l)	0,22	0,29	0,32
AST (μkat/l)	0,36	0,38	0,45
GGT (μkat/l)	0,19	0,22	0,27
CRP (mg/l)	0,65	0,90	2,90
Cholesterol (mmol/l)	4,39	4,53	4,68
TAG (mmol/l)	0,74	0,84	1,08
HDL (mmol/l)	1,42	1,58	1,80
Celkový cholesterol/HDL	2,37	2,84	3,30
LDL (mmol/l)	2,35	2,45	2,71
Glukosa (mmol/l)	4,25	4,65	4,77

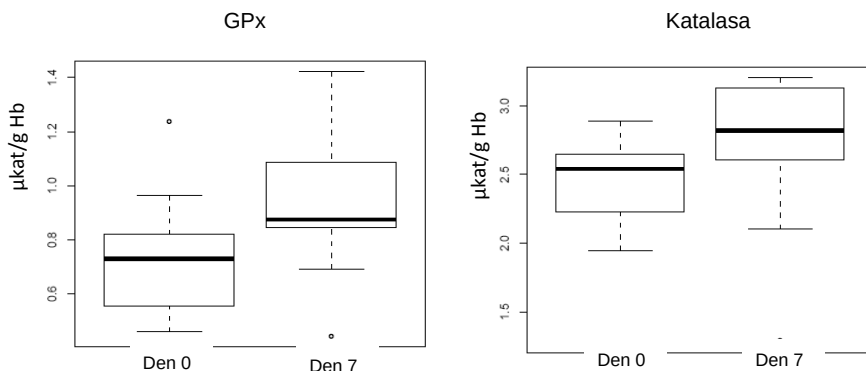
Tab. 31: Markery oxidačního stresu v krvi

Erythrocyty:	Den 0	Den 7
GSH (μmol/g Hb)	67,3/93,7/133,6	91,3/111,5/126,0
GST (μkat/g Hb)	2,07/2,4/2,78	1,68/1,97/2,42
GSHred (μkat/g Hb)	0,85/1,15/1,7	0,87/1,12/1,56
GPx (U/g Hb)	0,57/0,73/0,81	0,85/0,88/1,08*
SOD (U/g Hb)	84,0/86,2/91,9	83,6/86,1/91,8
Katalasa (μkat/g Hb)	2,2/2,5/2,6	2,6/2,8/3,1*
TBARS (μmol/g Hb)	513,8/522,1/544,4	550,1/611,8/697,8*
Plazma:		
TAC (mmol/l)	1,8/1,9/1,9	1,9/1,9/1,9
TBARS (μmol/g proteinu)	1,8/2,2/2,6	1,9/2,1/2,5*
SH skupiny (μmol/g proteinu)	29,4/33,1/35,4	32,4/37,7/43,6
AOPP (μmol/l)	137,1/152,2/179,6	83,3/98,65/153,6 [#]
OxLDL (U/l)	28,3/31,6/38,2	22,2/26,3/33,9

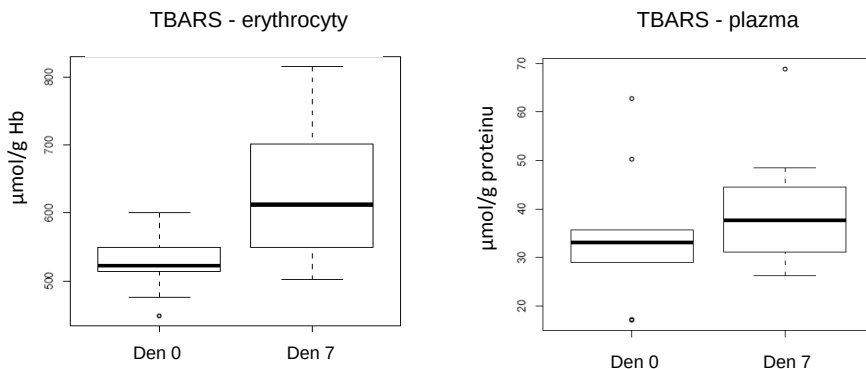
Data jsou vyjádřena jako 1. kvartil/medián/3. kvartil

* Medián se statisticky významně lišil od hodnoty ve dni 0 ($p < 0,05$)

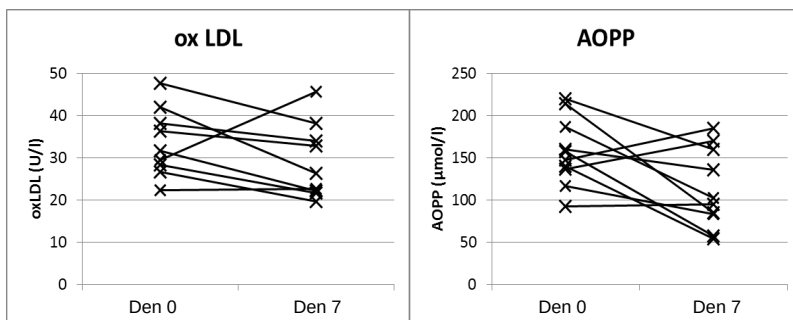
[#] Medián se statisticky nevýznamně lišil od hodnoty ve dni 0 ($p < 0,1$)



Obr. 24: Vliv konzumace plodů *L. caerulea* L. na aktivitu glutathionperoxidasy (GPx) a katalasy. V krabicovém grafu je medián znázorněn jako vertikální silná úsečka. Pole krabice se rozprostírá od 25. do 75. percentilu a antény sahají od nejnižší hodnoty k nejvyšší; ○ - odlehlé hodnoty.



Obr. 25: Vliv konzumace plodů *L. caerulea* L. na hladinu TBARS v erythrocytech a v plazmě. V krabicovém grafu je medián znázorněn jako vertikální silná úsečka. Pole krabice se rozprostírá od 25. do 75. percentilu a antény sahají od nejnižší hodnoty k nejvyšší; ° - odlehle hodnoty.



Obr. 26: Vliv konzumace plodů *L. caerulea* L. na hladinu oxLDL a AOPP u jednotlivých dobrovolníků.

5.3.1 Studie obsahových látek a metabolitů v plazmě a moči

HPLC/DAD-ESI-MS analýza fenolových sloučenin a jejich metabolitů byla provedena v plazmě a moči dobrovolníků před a po jedno-týdenní konzumaci plodů *L. caerulea* L.. Identifikace sloučenin byla udělána se sérií 36 standardů, zejména fenolových kyselin, dále

hippurové kyseliny a vybraných polyfenolů (Tab. 14). Koncentrace analyzovaných fenolových sloučenin v plazmě byla pod detekčním limitem v obou testovacích časech.

Fenolové sloučeniny v moči byly analyzovány přímo bez enzymatického štěpení (volné fenolové sloučeniny), a navíc po dodatečné reakci s dekonjugáčními enzymy, β -glukuronidasou (EC 3.2.1.31) a sulfatasou (EC 3.1.6.1). Po enzymatickém štěpení byla kvantifikována celková frakce pro jednotlivé fenolové látky. V moči dobrovolníků byly nalezeny deriváty benzoové kyseliny (BA, 4-HBA, DHBA, 3,4-DHBA, 4-HMBA), všechny analyzované deriváty fenyloctové kyseliny, dva deriváty fenypropionové kyseliny (3,4-DHPPA, 4-HMPPA), deriváty skořicové kyseliny (3-HCA, 4-HCA, 3-HMCA, 4-HMCA), dále potom HA a její 2-hydroxy derivát. Statisticky významné zvýšení koncentrace volných sloučenin mezi oběma testovanými časy bylo zaznamenáno pouze u HA ($p=0,0098$), DHBA ($p=0,062$) and 4-HMPA ($p=0,064$). Statisticky významné zvýšení celkového obsahu bylo zaznamenáno u 3,4-DHBA ($p=0,0039$); DHBA ($p=0,0039$); 4-HCA ($0,013$); 3-HCA ($p=0,064$); HA ($p=0,027$); 3-HMCA ($p=0,0019$); 4-HMCA ($p=0,0098$) a BA ($p=0,064$). Nejvíce zastoupenou byla HA, jejíž hladina volné frakce na začátku studie byla 199 238 $\mu\text{g}/\text{mg}$ kreatininu a zvýšila se na 476 937 $\mu\text{g}/\text{mg}$ ke konci studie. Koncentrace ostatních metabolitů byla nejméně 40 $\times$ nižší, vyjma 4-HPA a PA, jejichž hladiny nebyly intervencí ovlivněny. Největší relativní nárůst byl zaznamenán u 3,4-DHBA (Tab. 32, Obr. 27).

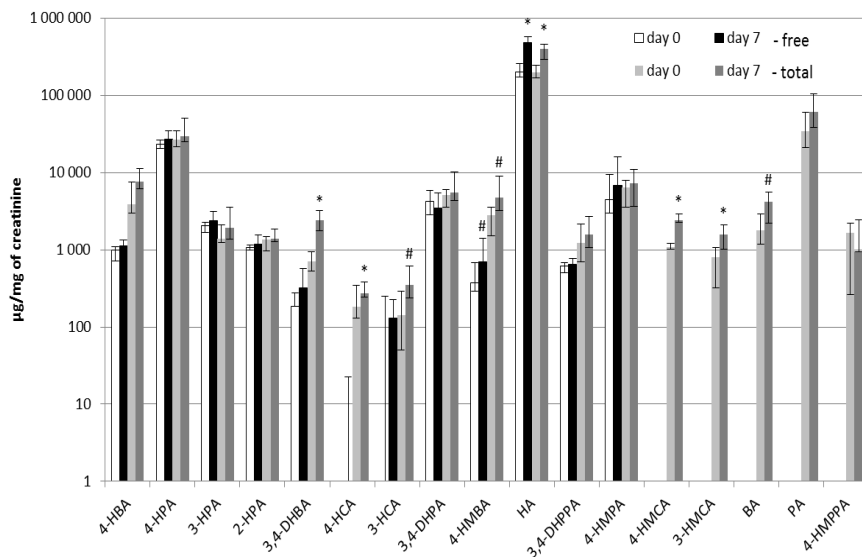
Tab. 32: Koncentrace vybraných fenolových kyselin v moči ($\mu\text{g}/\text{mg}$ kreatininu)

	Volné fenolové kyseliny		Celkové fenolové kyseliny	
	Den 0	Den 7	Den 0	Den 7
BA	0/0/0	0/0/0	1169/1782/2870	2207/4156/5597 [#]
3,4-DHBA	0/184.4/273.2	20.6/323.2/571.6	523.1/708.8/945.3	1762/2417/3189 [#]
4-HMBA	291.8/373.1/683.8	414.6/701.8/1416 [#]	1512/2779/3526	3 233/4753/8933 [#]
3-HCA	0/0/250.8	17.9/129.7/223.1	50.3/142.8/286.8	239.9/351.4/618.2*
4-HCA	0/0/0	0/0/22.5	128.9/181.8/342.9	241.5/270.5/380.6*
4-HMCA	0/0/0	0/0/0	1009/1086/1221	2256/2395/2905*
3-HMCA	0/0/0	0/0/246.2	317.8/805.0/1067	1020/1570/2112*
HA	170/199/257 ($\times 10^3$)	379/477/567 ($\times 10^3$)	167/195/244 ($\times 10^3$)	290/399/455 ($\times 10^3$) [*]

Data jsou vyjádřena jako 1. kvartil/medián/3. kvartil

* Medián se statisticky významně lišil od hodnoty ve dni 0 ($p < 0,05$)

[#] Medián se statisticky nevýznamně lišil od hodnoty ve dni 0 ($p < 0,1$)



Obr. 27: Volné a celkové fenolové kyseliny v moči dobrovolníků ($n=10$) před (den 0) a po (den 7) jednotýdenní konzumaci plodů *L. caerulea* L.. Fenolové kyseliny byly identifikovány na základě MS2 fragmentace standardů (zkratky viz Tab. 14) a data byla vyjádřena jako medián (1. kvartil – 3. kvartil)

6 Diskuse

Tato disertační práce předkládá spektrum výsledků, které lze využít při vývoji a výrobě doplňků stravy v praxi. V současném průmyslu se počítá se stabilitními studiemi zaměřenými na hodnocení fyzikálně-chemických parametrů, běžné však není studium stability aktivních látek ve finálních lékových formách. Stejně tak srovnání vlastností rostlinných extraktů připravených za různých podmínek by se mělo stát standardní součástí vývoje doplňků stravy. Znalost biologické aktivity a výsledků klinických studií, které jsou předlohou pro tvorbu a schvalování zdravotních tvrzení, výrobci v současné době v dřtivé většině získávají pomocí literárních rešerší. Dosud však není běžnou praxí studium metabolitů aktivních látek používaných při výrobě doplňků stravy. Tato práce by tedy mohla být námětem pro diskusi nad novými tématy týkajícími se zlepšení zavádění nových vědeckých poznatků do průmyslové praxe. V následující části jsou rozebrány jednotlivé výsledky.

6.1 Příprava a hodnocení extraktů

Pro přípravu extraktů byly použity lyofilizované plody *L. caerulea* L.. Z experimentálních dat vyplývá, že lyofilizace celých plodů je nejvýhodnější metoda pro získání vysušeného materiálu, který si uchová nezměněné obsahové látky a biologické (i senzorké) charakteristiky. Lyofilizát je možno dlouhodobě skladovat [169].

Lyofilizát je možno převést na jemně mletý prášek, případně oddělit semínka plodů pro analytické stanovení lipidové frakce. Lyofilizát je také vhodná forma pro biologické testy.

Bylo lyofilizováno celkem 88,9 kg surových zmrazených plodů *L. caerulea* L. ze sklizně let 2006 a 2007. Získáno bylo 12,9 kg lyofilizátu, což odpovídá výtěžku 14,5 % [169].

Pro případnou průmyslovou extrakci plodů *L. caerulea* L. je důležitá možnost extrakce velkého množství plodů s optimalizovanými náklady. To znamená vypracování metody respektující podmínky reálného provozu, jejichž určitá (nepředvídatelná) změna nemá žádný (nebo minimální) vliv na kvalitativní a kvantitativní průběh dané operace. Pokusili jsme se v laboratorním měřítku nasimulovat reálné podmínky průmyslové extrakce maximálním zjednodušením všech kroků. Vynechali jsme mletí lyofilizátu, nebyla

použita ochranná atmosféra, pracovalo se za přístupu (denního) světla, jednotlivé operace na sebe časově ihned nenavazovaly.

Jako extrakční činidlo jsme zvolili 80% ethanol (okyselený) pro jeho nízkou toxicitu a snadné odstranění z finálního extraktu. K této „průmyslové“ extrakci byla zároveň provedena (kontrolní) „laboratorní“, při níž byly striktně dodrženy tyto podmínky: zamezení přístupu světla, laboratorní teplota, inertní Ar atmosféra. Tyto dva extrakty připravené za různých podmínek byly podrobeny srovnání na subbuněčných a buněčných systémech *in vitro*.

Pro orientační měření redukční kapacity byla nejdříve zvolena metoda s využitím Folin-Ciocalteuova činidla. Tato metoda bývá někdy špatně interpretována a zaměňována se stanovením obsahu fenolových látek [170], proto je výsledná hodnota vztažena na ekvivalenty galové kyseliny. Thompson et al. [60] určili tuto hodnotu na 427 – 1142 mg GAE/100 g čerstvých plodů. Čerstvé plody *L. caerulea* L. z ČR dosahovaly hodnoty pouze 145 mg GAE/100 g plodů [171]. V případě extraktů P a L byly tyto hodnoty 1911 mg GAE/100 mg, resp. 1728 mg GAE/100 mg lyofilizovaných plodů, to při přepočtu na čerstvé plody odpovídá 277 mg GAE/100 mg, resp. 251 mg GAE/100 mg plodů.

Hodnota IC_{50} při zhášení DPPH radikálu byla stanovena na 477,8 ($\pm 67,9$) $\mu\text{g/ml}$ u extraktu L a pro extrakt P 478,3 ($\pm 81,03$) $\mu\text{g/ml}$. V dřívějších testech u fenolové frakce byla tato hodnota $4,4 \pm 0,5$ $\mu\text{g/l}$ [171], to je srovnatelné s výsledky ethanolových extraktů při přepočtu na ekvivalent čerstvých plodů, stejně tak jako jiných bobulovitých plodů (*Vaccinium myrtillus*, *V. ashei*, *Ribes nigrum*, *Aronia melanocarpa*, *Sambucus nigra*), kde se hodnota IC_{50} pohybuje okolo 1000 $\mu\text{g/ml}$ [172].

6.2 Stabilitní studie

Tablety Lonicera obsahují prášek z lyofilizovaných plodů *L. caerulea* L.. Jak bylo zmíněno v kapitole 6.1, lyofilizát má mnoho předností. Avšak vzhledem k vysokému obsahu monosacharidů je prášek silně hygroskopický a je problematické zajistit stabilitu ve formě tablet. Z výsledků vyplývá, že pro stabilitu tablety je vhodnější primární obal tvořený blistrem PVC s hliníkovou folií, než plastový kontejner. Přesto došlo u střednědobé stabilitní studie po 12 měsících k popraskání všech tablet v blistrech. U dlouhodobé SS č. 536 přípravku Lonicera baleného v blistrech se ukázalo, že i v čase T5 (po 18 měsících) je forma tablety vyhovující. Tablety byly popraskané až v čase T6 (po 24 měsících).

V průběhu vývoje pevné lékové formy v rámci projektu FT-TA3/024 bylo zjištěno, že suroviny *V. macrocarpon* Ait. výrobce Decas Botanical synergies NutriCran (sušená šťáva

s obsahem 1 % anthokyanidinů) a PaCran (lyofilizované celé plody s obsahem 1,5 % proanthokyanidinů) nelze zpracovávat do tablet odpovídající jakosti a potřebám průmyslového zpracování s větším obsahem podílu extraktu než 25%. Z tohoto důvodu byl vývoj pevné lékové formy s těmito extrakty zastaven a pokračovalo se s extraktem *V. macrocarpon* Ait. HiPAC (extrakt standardizovaný na 4 % proanthokyanidinů). Tento extrakt obsahuje pouze stopová množství monosacharidů, na rozdíl od surovin Nutricran a PaCran a je tedy méně hygroskopický. S extraktem HiPAC jsme vyvinuli potahovanou tabletu s obsahem 450 mg, při dávkování dvě tablety je příjem proanthokyanidinů 36 mg denně. Vzhledem k hmotnostní proměnlivosti, která souvisí s výrobou jader na rotačním tabletovacím stroji a pro zajištění obsahu extraktu *V. macrocarpon* Ait. HiPAC, bylo přistoupeno k nadsazení extraktu *V. macrocarpon* Ait. HiPAC v tabletě o 5 % na hodnotu 473 mg na tabletu. Tento přípravek je na trhu pod názvem Urinal Akut a s tímto přípravkem byly také provedeny SS (č.346 – 349).

Stanovení redukční kapacity metodou dle Folin-Ciocalteu při hodnocení SS č. 346 – 349 ukázalo, že nedochází k žádným významným změnám v tabletách Urinal Akut.

Analýzou HPLC/MS se zjistilo, že ve všech vzorcích ze SS č. 347-349 (v časech T0 - T7) docházelo ke snižování obsahů všech sledovaných proanthokyanidinů. Např. obsah epikatechinu klesl na hodnotu menší než 5 % původního množství (oproti odběru v čase T0). Rovněž sumy jednotlivých proanthokyanidinů v jednotlivých časových bodech až do T6 klesaly. Nicméně analýzou odběru T7 byly nalezeny mírně vyšší, statisticky nevýznamné obsahy dimeru, trimeru a sumy všech proanthokyanidinů ve srovnání s odběrem v čase T6. Vzhledem k zachování redukční kapacity tablet Urinal Akut během SS a k tomu, že proanthokyanidiny jsou v těchto tabletách hlavními fenolovými sloučeninami, dochází pravděpodobně ke změnám v zastoupení jednotlivých polymerů.

6.3 Intervenní studie

Cílem studie bylo stanovit markery oxidačního stresu v krvi a metabolity polyfenolů po konzumaci plodů *L. caerulea* L.. Některé studie potvrdily vztah mezi antioxidačním stavem plazmy a koncentrací anthokyaninů a dalších fenolových sloučenin při konzumaci potravin bohatých na anthokyaniny [118, 173]. Dle našich současných znalostí dosud neexistuje podobná studie, která by zkoumala vliv konzumace plodů *L. caerulea* L..

Předchozí studie v podmínkách *in vitro* dokázaly, že polyfenolová frakce *L. caerulea* L. účinně zháší DPPH a superoxidový radikál, inhibuje peroxidaci mikrosomů, oxidaci LDL a chrání potkaní hepatocyty a lidské endotelové buňky proti oxidačnímu poškození.

Tyto účinky jsou pravděpodobně dány antioxidačními vlastnostmi látek plodů *L. caerulea* L., zejména antokyaniny [171, 174].

Dieta obohacená anthokyaniny může zvyšovat aktivitu některých antioxidačních enzymů, zejména katalasy a glutathionperoxidasy (GPx), jak bylo ukázáno ve studii na potkaních při dlouhodobém příjmu anthokyaninové frakce z ostružin [175]. V naší intervenční studii jsme zjistili, že konzumace plodů *L. caerulea* L. dobrovolníky vedla ke zvýšení aktivity katalasy a GPx v erythrocytech. Obdobné výsledky byly potvrzeny v 30-denní studii, kdy pacienti s hypercholesterolemií užívali 240 mg anthokyaninů z plodů *Aronia melanocarpa* Michx. a došlo k významnému zvýšení aktivity GPx a katalázy [176]. Jak bylo ukázáno dříve v testech na buněčných kulturách a na zvířatech, nadměrná exprese superoxidismutasy, katalasy a GPx vedla k ochraně před oxidačním stresem [177]. V jiné, 6-denní studii, konzumace vysokého množství ovoce a zeleniny zvyšovala aktivitu GPx ve srovnání s placebem a doplňkem stravy s obsahem vitaminů a minerálů u zdravých dobrovolníků. Autoři této studie rovněž na podkladě svých předchozích výsledků předpokládají, že zvýšení aktivity GPx v erythrocytech ukazuje na regulaci neovlivněnou genovou expresí [178].

Studie rovněž ukázala, že zvýšený příjem plodů *L. caerulea* vyvolává u červených krvinek zvýšení koncentrace TBARS. Prooxidační účinek obsahových látek plodu *Lonicery* nebo jejich metabolitů na erytrocyt lze vysvětlit afinitou erythrocytární membrány k polyfenolům [179]. Pravděpodobně vznikají komplexy polyfenolů se železem, které jsou pak odpovědné za prooxidační aktivitu. Psotová et al. [180] zjistili, že bimodální účinek (anti-/prooxidační) fenolových kyselin izolovaných z *Prunella vulgaris* závisí na jejich koncentraci. V koncentracích 0,1 - 1,0 mM vykazovala např. protokatechová kyselina protektivní účinek vůči peroxidačnímu poškození erythrocytárních lipidů a statisticky významně snižovala produkci TBARS u hepatocytů intoxikovaných trojmocným železem. V koncentracích nad 2,5 mM tato kyselina působila prooxidačně a došlo ke zvýšení TBARS [181].

Během studie jsme naměřili mírné, ale statisticky nevýznamné snížení hladiny produktů pokročilé oxidace proteinů (AOPP). AOPP jsou vytvářeny při reakci volných radikálů s proteiny. Mohou aktivovat prozánětlivé cytokiny, které iniciují oxidační poškození neutrofilů, monocytů a T-lymfocytů [182] a mohou vést k chronickým onemocněním. Účinek rostlinných polyfenolů na snížení hladiny AOPP byl poprvé popsán ve studii se zdravými ženami po konzumaci sušené šťávy *V. macrocarpon* Ait. (Nutricran) [183].

V podmínkách *in vivo* bylo zjištěno, že většina anthokyaninů je střevní mikroflorou přeměňována na fenolové kyseliny a aldehydy a množství fenolových kyselin v moči je významně vyšší, než přijatých anthokyaninů [184]. Přesto větší část metabolitů anthokyaninů zůstává stále neznámá [185].

Z 36 testovaných sloučenin ve studii bylo 18 v moči přítomno jak před, tak po konzumaci plodů. Nejvyšší koncentrace byla stanovena u hippurové kyseliny (200-500 µg/mg kreatininu). Po konzumaci byl zaznamenán zhruba 100% nárůst koncentrace volné i celkové frakce hippurové kyseliny. Zvýšení koncentrace bylo rovněž detekováno také u dalších 17 fenolových sloučenin a kyselin benzoové. Na základě výsledků analýz volných a celkových frakcí fenolových kyselin bylo zjištěno, že přibližně 50 % kyselin (w/w) je v moči konjugovaných ve formě glukuronidů a sulfátů. Tento podíl konjugovaných forem byl relativně stejný před i po konzumaci plodů. Nemůžeme rozlišit, nakolik je do zvýšení koncentrace zahrnut vliv konzumace plodů a nakolik vliv běžné stravy. Nicméně můžeme předpokládat, že pokud je zvýšení koncentrace statisticky významné, jedná se u dané látky o metabolit obsahových látek plodů *L. caerulea* L.. Největší významná změna mezi konjugovanými a nekonjugovanými formami testovaných sloučenin byla zjištěna u protocatechové ($3.4 \times$ více po konzumaci plodů oproti stavu na začátku studie), 3-hydroxyskořicové ($2.5 \times$), benzoové ($2.3 \times$), ferulové ($2.2 \times$), hippurové a isoferulové ($2 \times$) (Obr. 27).

Ačkoliv mezi fenolovými kyselinami plodů *L. caerulea* L. dominuje chlorogenová kyselina [171], v moči dobrovolníku byla pod mezí detekce, tento fakt byl potvrzen i v jiných studiích. Chlorogenová kyselina je ve významné míře metabolisována střevní mikroflorou [186], a proto nedochází k exkreci močí v intaktní formě [187].

Nedošlo k ovlivnění parametrů bezpečnostní laboratoře ve srovnání se stavem na počátku studie. Konzumace plodů *L. caerulea* L. byla dobrovolníky dobře tolerována a byla bezpečná.

7 Závěry

Předkládaná disertační práce se zabývala studiem některých postupů extrakce, přípravy frakcí a hodnocením extraktů *L. caerulea* L. připravených za různých podmínek, dále studiem stability tablet s obsahem lyofilizovaných plodů *L. caerulea* L. a extraktů plodů *V. macrocarpon* Ait., a byla provedena intervenční studie s dobrovolníky konzumujících plody *L. caerulea* L. s cílem zjistit vliv na markery oxidačního stresu a studium metabolitů. Z výsledků vyplývají následující závěry:

- Při testech antioxidační aktivity, analýzou celkových fenolových sloučenin, fenolových kyselin, flavonoidů, anthokyaninů a testech cytotoxicity nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi extrakty *L. caerulea* L. připravenými nasimulováním „průmyslových“ podmínek a za laboratorních podmínek.
- Vzhledem k hygrokopickým vlastnostem lyofilizovaných plodů *L. caerulea* L. musely být stabilitní studie tablet Loncera předčasně ukončeny. Jako nejvhodnější obal pro zvýšení stability těchto tablet se jeví PVC blistr s hliníkovou folií.
- Přípravky Urinal Akut, Denoxinal New a Urinal New vyhovovaly ve všech časových bodech všem sledovaným parametrům.
- Redukční kapacita se v průběhu stabilitní studie u přípravku Urinal Akut v dlouhodobém i zrychleném stabilitním testu významně neměnila.
- Během studie dochází k postupnému snižování obsahů všech sledovaných proanthokyanidinů, nicméně obsah některých polymerů proanthokyanidinů s časem stoupá.
- Konzumace plodů *L. caerulea* L. byla dobře tolerována, nedošlo k ovlivnění parametrů bezpečnostní laboratoře. Celková antioxidační kapacity plazmy nebyla konzumací ovlivněna. Účinek na markery oxidačního stresu je sporný. Zatímco v plazmě došlo k mírnému antioxidačnímu účinku, v erythrocytech byl zaznamenán prooxidační efekt.
- Po konzumaci plodů jsme našli v moči dobrovolníků zvýšenou koncentraci volných a konjugovaných forem fenolových kyselin a dalších metabolitů.

ZÁVĚRY

Nejvíce zastoupeným metabolitem byla hippurová kyselina, k největšímu relativnímu nárůstu koncentrace došlo u protokatechové kyseliny.

8 Seznam prací vztahujících se k disertaci

8.1 Publikace

1. Švarcová I., Heinrich J., Valentová K.: Berry fruits as a source of biologically active compounds: The case of *Lonicera caerulea*. Biomed. Pap. 151 (2), 1 – 12 (2007).
2. Heinrich J., Švarcová I., Valentová K.: Plody *Lonicera caerulea*: perspektivní funkční potravina a zdroj biologicky aktivních látek. Chem. Listy 102, 245–254 (2008).
3. Palíková I., Heinrich J., Bednář P., Marhol P., Křen V., Cvak L., Valentová K., Růžicka F., Holá V., Kolář M., Šimánek V., Ulrichová J.: Constituents and antimicrobial properties of blue honeysuckle, a novel source for phenolic antioxidants. J. Agric. Food Chem. (2008): 56, 11883-11889.
4. Heinrich J., Valentová K., Vacek J., Palíková I., Zatloukalová M., Kosina P., Ulrichová J., Vrbková J., Šimánek V. Blue honeysuckle fruit intake alters the oxidative stress markers and increases urinary excretion of phenolic acids in healthy human subjects. J. Agric. Food Chem. Zasláno do tisku.

8.2 Příspěvky na konferencích

1. Švarcová I., Heinrich J., Bednář P., Křen V., Ulrichová J., Šimánek V., Valentová K.: Main components and radical scavenging activity of *Lonicera caerulea* L. var. kamtschatica berries. 50 Years of the Phytochemical Society of Europe, 11-14 April 2007, Cambridge, Velká Británie. Abstract book str. 94-95.
2. Ulrichová J., Bednář P., Křen V., Valentová K., Heinrich J., Švarcová I., Svobodová A., Reichenbach R., Cvak L., Šimánek P.: Characterization of *Lonicera caerulea* anthocyanins and phenolics by μ LC/MS² and assessment of their biological activities. 3rd International Conference on Polyphenols and Health, November 25 - 28 2007, Kyoto.
3. Palikova I., Heinrich J., Bednar P., Sima P., Ruzicka F., Simanek V., Ulrichova J. Fruits of *Lonicera caerulea*: A prospective functional food for central Europe. Proceedings of the conference Food and Function 2009, Zilina:86-87.
4. Marhol P., Myjavcová R., Bednář P., Heinrich J., Ulrichová J., Šimánek V., Křen V.: Characterization of anthocyanins and pyranoanthocyanins in *Lonicera caerulea*

- L. berries by HPLC-DAD-MS Analysis. Abstracts of 34th International symposium on HPLC separations and related techniques, Dresden, 2009: 541.
5. Marhol P., Myjavcová R., Bednář P., Ulrichová J., Šimánek V., Heinrich J., Křen V.: Anthocyanins and Pyranoanthocyanins in *Lonicera caerulea* L. Berries, IWA 2009, 5th International Workshop on Anthocyanins, Nagoya (Japan), 15.9.-18.9.2009. Book of abstracts: p. 41, poster P09 and oral presentation.

9 Ostatní práce

9.1 Publikace

1. Rulcová J., Heinrich J., Palíková I.: Výsledky klinického sledování přípravku Acneon u pacientů s acne vulgaris. Dermatol. praxi 2010; 4(4): 202-204.
2. Heinrich J., Barna M., Hladíková, M., Palíková I.: Vliv kombinace glukosamin sulfátu a chondroitin sulfátu na projevy osteoartrózy. Causa Subita 2010; 13(4): 170-173.

9.2 Příspěvky na konferencích

1. Valentová K., Heinrich J., Stejskal D., Bednář P., Vostálová J., Číhalík Č., Večeřová R., Koukalová D., Kolář M., Reichenbach R., Škňouřilová L., Ulrichová J., Šimánek V.: Pilot double blind placebo controlled study of cranberry on healthy women. 3rd International Conference on Polyphenols in Nutrition and Health, October 26-27, 2006, Malta.
2. Heinrich J., Hrstková H.: Effect of long-term usage of food supplement for children. Conference Vitamins 2007, September 19-21 2007, Prague.
3. Heinrich J., Hrstková H., Palikova I.: Use of multivitamin food supplement can decrease sick days of children. Proceedings of the conference Food and Function 2009, Zilina:71.
4. Heinrich J., Barna M. The combination of glucosamine sulphate and chondroitin sulphate can decrease symptoms of osteoarthritis. 10th International Nutrition and Diagnostics Conference, 2010, Prague, Abstract book, p.93.

10 Literatura

1. Mandal, S.M., D. Chakraborty, and S. Dey, *Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses*. Plant Signal Behav, 2010. **5**(4): p. 359-68.
2. Esposito, K., et al., *Effects of a Mediterranean-style diet on the need for antihyperglycemic drug therapy in patients with newly diagnosed type 2 diabetes: a randomized trial*. Ann Intern Med, 2009. **151**(5): p. 306-14.
3. Svačina, S., *Klinická dietologie* 2008, Praha: Grada Publishing.
4. Rapport, L. and B. Lackwood, *Nutraceuticals* 2002, London: Pharmaceutical Press.
5. Barnes, S., *Nutritional genomics, polyphenols, diets, and their impact on dietetics*. J Am Diet Assoc, 2008. **108**(11): p. 1888-95.
6. Dwyer, J.T., *Do functional components in foods have a role in helping to solve current health issues?* J Nutr, 2007. **137**(11 Suppl): p. 2489S-2492S.
7. Roberfroid, M.B., *What is beneficial for health? The concept of functional food*. Food Chem Toxicol, 1999. **37**(9-10): p. 1039-41.
8. Webb, G.P., *Dietary supplements and functional foods*. 2006, Oxford: Blackwell Publishing.
9. *Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2002/46/ES ze dne 10. června 2002 o sblížení právních předpisů členských států týkajících se doplňků stravy*. 2002; Available from: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=DD:13:29:32002L0046:CS:PDF>.
10. *Scientific concepts of functional foods in Europe*. Consensus document. Br J Nutr, 1999. **81 Suppl 1**: p. S1-27.
11. Verhagen, H., et al., *Status of nutrition and health claims in Europe*. Arch Biochem Biophys, 2010. **501**(1): p. 6-15.
12. Aggett, P.J., et al., *PASSCLAIM: consensus on criteria*. Eur J Nutr, 2005. **44 Suppl 1**: p. i5-30.
13. *Nariadení (EC) č. 1924/2006, Evropského parlamentu a rady, ze dne 20. prosince 2006, o výživových a zdravotních tvrzeních na potravinách*. 2006 [cited 2011 25.3.]; Available from: http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/en/oj/2007/l_012/l_01220070118en00030018.pdf.
14. *Claims That Can Be Made for Conventional Foods and Dietary Supplements* [cited 2011 25.3.]; Available from: <http://www.fda.gov/Food/LabelingNutrition/labelclaims/ucm111447.htm>.
15. Saito, M., *Role of FOSHU (food for specified health uses) for healthier life*. Yakugaku Zasshi, 2007. **127**(3): p. 407-16.
16. *Food for Specified Health Uses (FOSHU)* [cited 2011 25.3.]; Available from: <http://www.mhlw.go.jp/english/topics/foodsafety/fhc/02.html>.
17. Patel, D., Y. Dufour, and N. Domigan, *Functional food and nutraceutical registration processes in Japan and China: a diffusion of innovation perspective*. J Pharm Pharm Sci, 2008. **11**(4): p. 1-11.
18. Richardson, D., N. Binns, and P. Viner, *Guidelines for an evidence-based review system for the scientific justification of diet and health relationships under Article 13 of the new European legislation on nutrition and health claims*. Food. Sci. Technol. Bull., 2007. **3**(8): p. 83-97.
19. Richardson, D.P., *Health claims on foods: strength of the evidence and problems of proof* Food Sci. Technol. Bull. Funct. Foods 2009. **6**(1): p. 1-3.

20. EFSA delivers advice on further 808 health claims [cited 2011 28.3.]; Available from: <<http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/nda101019.htm>>.
21. EFSA. EFSA finalises the assessment of 'general function' health claims. Tiskové prohlášení EFSA, 28.7.2011
5.8.2011; Available from: <http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/110728.htm>.
22. EFSA. Claims on disease risk reduction and child development or health under Article 1428.3.2011; Available from: <<http://www.efsa.europa.eu/en/ndaclaims/ndaclaims14.htm>>.
23. RiceEvans, C.A., N.J. Miller, and G. Paganga, *Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids*. Free Rad. Biol. Med., 1996. **20**(7): p. 933-956.
24. Rosypal, S., *Přehled biologie*1994, Praha: Scientia. 635.
25. Anonym. Available from: <http://en.wikipedia.org/wiki/Blackcurrant>.
26. Pawvic. Available from: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Temnoplodec>.
27. Miya.m. Available from: http://cs.wikipedia.org/wiki/Lilek_vejcoplod%C3%BD.
28. Cstaffa. Available from: http://en.wikipedia.org/wiki/Rubus_occidentalis.
29. Mmxx. Available from: <http://en.wikipedia.org/wiki/Boysenberry>.
30. Ross, S.; Available from: http://en.wikipedia.org/wiki/Rubus_fruticosus.
31. Velela. Available from: http://en.wikipedia.org/wiki/Rubus_caesius.
32. Jakubec, K.; Available from: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Malina.jpg>.
33. Gaya, D.; Available from: http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Vaccinium_uliginosum_fruit.jpg.
34. Vaculík, F.; Available from: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Blueberries.jpg>.
35. JoJan. 2005; Available from: [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Vaccinium_corymbosum\(01\).jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Vaccinium_corymbosum(01).jpg).
36. Sten. 2004; Available from: <http://da.wikipedia.org/wiki/Fil:Vitis-vinifera.JPG>.
37. PereslavlFoto. 2008; Available from: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Smorodina-vetka.jpg>.
38. Röhl, M. 2005; Available from: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Sambucus_nigra2.jpg.
39. Sáček, I. 2009; Available from: http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Amelanchier_ovalis3.JPG.
40. Shahidi, F., Naczsk, M., *Phenolics in Food and Nutraceuticals*. 2004. **490**: p. 131-155.
41. Karakaya, S., *Bioavailability of phenolic compounds*. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 2004. **44**(6): p. 453-464.
42. Quideau, S., et al., *Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis*. Angew Chem Int Ed Engl, 2011. **50**(3): p. 586-621.
43. Pietta, P.G., *Flavonoids as antioxidants*. J. Nat. Prod., 2000. **63**(7): p. 1035-1042.
44. Ferrer, J.L., et al., *Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids*. Plant Physiol Biochem, 2008. **46**(3): p. 356-70.
45. Lea, A.G.H., *HPLC in Food Analysis*1988, London: Academic Press.
46. Copikova, J., et al., *Natural colorant*. Chem. Listy, 2005. **99**(11): p. 802-816.
47. Hořta, P., P. Dostálek, and B. Basařová, *Xanthohumol - chmelová pryskyřice nebo polyfenol?* Chem. Listy, 2004. **98**: p. 825 – 830.
48. Bollinger, M., *Keře*1998, Praha: Ikar.
49. Dubois, J.B. and F. Blazich, *Lonicera L.*1992, <http://www.nsl.fs.fed.us/wpsm/Lonicera.pdf>, staženo 14.4.

50. Liu, C.H., et al., *Comparative Experiment on Hot-Air and Microwave-Vacuum Drying and Puffing of Blue Honeysuckle Snack*. International Journal of Food Engineering, 2009. **5**(4).
51. Hummer, K.E., *Blue honeysuckle: A new berry crop for North America*. Journal of the American Pomological Society, 2006. **1**(1).
52. *Kamčatská borůvka*. 2011 [cited 2011 3.9. 2011]; Available from: <http://chovanec.cz/zahradnictvi/obchod-4.html>.
53. Liu, C.H., et al., *Optimising microwave vacuum puffing for blue honeysuckle snacks*. International Journal of Food Science and Technology, 2010. **45**(3): p. 506-511.
54. Zadernowski, R., M. Naczki, and J. Nesterowicz, *Phenolic acid profiles in some small berries*. J Agric Food Chem, 2005. **53**(6): p. 2118-24.
55. Thompson, M., Chaovanalikit A. , *Preliminary observation on adaptation and nutraceutical values of blue honeysuckle (Lonicera caerulea) in Oregon USA*. Acta Horti, 2003: p. 65-72.
56. Kähkönen, M., Hopla, A., Heinonen, M., *Berry phenolics and their antioxidant activity*. J Agric Food Chem, 2001. **49**: p. 4076-4082.
57. Chaovanalikit, A. *Anthocyanins, total phenolics, and antioxidant capacity of bluehoneysuckles*. . in *The 30th Congress on Science and Techonology of Thailand*. 2004. Bangkok, Thailand.: Abstract book (bez editora).
58. Ochmian, I., J. Grajkowski, and K. Skupien, *Yield and Chemical Composition of Blue Honeysuckle Fruit Depending on Ripening Time* Bulletin UASVM Horticulture, 2010. **67**(1): p. 138-146.
59. Svarcova, I., Heinrich, J., Bednar, P., Kren, V., Cvak, L., Ulrichova, J., Simanek, V., Valentova, K. *Main components and radical scavenging activity of Lonicera caerulea L. var. kamschatica berries*. in *50 Years of the Phytochemical Society of Europe*. 2007. Cambridge, UK.
60. Chaovanalikit, A., M.M. Thompson, and R.E. Wrolstad, *Characterization and quantification of anthocyanins and polyphenolics in bluehoneysuckle (Lonicera caerulea L.)*. J Agric Food Chem, 2004. **52**(4): p. 848-52.
61. Deineka, V.I., et al., *Anthocyanins from Fruit of Some Plants of the Caprifoliaceae Family*. Chemistry of Natural Compounds, 2005. **41**: p. 162-164.
62. Cotelie, N., *Role of flavonoids in oxidative stress*. Curr. Top. Med. Chem., 2001. **1**(6): p. 569-590.
63. Firakova, S., et al., *Quantitative relationships between structure and ability of flavonoids to reduce ferric complex*. Chem. Listy, 2006. **100**(11): p. 980-986.
64. Lachman, J., et al., *The effect of selected factors on polyphenol content and antioxidant activity in potato tubers*. Chem. Listy, 2006. **100**(7): p. 522-527.
65. Lachman, J., K. Hamouz, and M. Orsak, *Red and purple potatoes - A significant antioxidant source in human nutrition*. Chem. Listy, 2005. **99**(7): p. 474-482.
66. Quideau, S., et al., *Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis*. Angew Chem Int Ed Engl.
67. Howell, A.B., *Cranberry proanthocyanidins and the maintenance of urinary tract health*. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 2002. **42**(3): p. 273-278.
68. Ali, B.H., H.M. Mousa, and S. El-Mougy, *The effect of a water extract and anthocyanins of Hibiscus sabdariffa L. on paracetamol-induced hepatotoxicity in rats*. Phytother. Res., 2003. **17**(1): p. 56-59.
69. Rechner, A.R., et al., *The metabolism of dietary polyphenols and the relevance to circulating levels of conjugated metabolites*. Free Rad. Res., 2002. **36**(11): p. 1229-1241.

-
70. Wu, C.H., et al., *Inhibition of advanced glycation endproduct formation by foodstuffs*. Food Funct. **2**(5): p. 224-34.
 71. Peng, X., et al., *Naturally occurring inhibitors against the formation of advanced glycation end-products*. Food Funct. **2**(6): p. 289-301.
 72. Seeram, N.P. and M.G. Nair, *Inhibition of lipid peroxidation and structure-activity-related studies of the dietary constituents anthocyanins, anthocyanidins, and catechins*. J. Agric. Food Chem., 2002. **50**(19): p. 5308-5312.
 73. Kowalczyk, E., et al., *Anthocyanins in medicine*. Pol. J. Pharmacol., 2003. **55**(5): p. 699-702.
 74. Wang, L.S. and G.D. Stoner, *Anthocyanins and their role in cancer prevention*. Cancer Lett, 2008. **269**(2): p. 281-90.
 75. Feng, R., et al., *Cyanidin-3-rutinoside, a natural polyphenol antioxidant, selectively kills leukemic cells by induction of oxidative stress*. J Biol Chem, 2007. **282**(18): p. 13468-76.
 76. Hafeez, B.B., et al., *A dietary anthocyanidin delphinidin induces apoptosis of human prostate cancer PC3 cells in vitro and in vivo: involvement of nuclear factor-kappaB signaling*. Cancer Res, 2008. **68**(20): p. 8564-72.
 77. Syed, D.N., et al., *Delphinidin inhibits cell proliferation and invasion via modulation of Met receptor phosphorylation*. Toxicol Appl Pharmacol, 2008. **231**(1): p. 52-60.
 78. Cvorovic, J., et al., *Oxidative stress-based cytotoxicity of delphinidin and cyanidin in colon cancer cells*. Arch Biochem Biophys. **501**(1): p. 151-7.
 79. Pan, M.H., C.S. Lai, and C.T. Ho, *Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids*. Food Funct., 2010.
 80. Fox, L., S. Hegde, and J.E. Gumperz, *Natural killer T cells: innate lymphocytes positioned as a bridge between acute and chronic inflammation?* Microbes Infect. **12**(14-15): p. 1125-33.
 81. Muller, I., et al., *Polymorphonuclear neutrophils and T lymphocytes: strange bedfellows or brothers in arms?* Trends Immunol, 2009. **30**(11): p. 522-30.
 82. Funk, C.D., *Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology*. Science, 2001. **294**(5548): p. 1871-5.
 83. Serhan, C.N. and J. Savill, *Resolution of inflammation: the beginning programs the end*. Nat Immunol, 2005. **6**(12): p. 1191-7.
 84. Nathan, C. and A. Ding, *Nonresolving inflammation*. Cell. **140**(6): p. 871-82.
 85. Hou, D.X., et al., *Molecular Mechanisms Behind the Chemopreventive Effects of Anthocyanidins*. J Biomed Biotechnol, 2004. **2004**(5): p. 321-325.
 86. Leifert, W.R. and M.Y. Abeywardena, *Cardioprotective actions of grape polyphenols*. Nutr Res, 2008. **28**(11): p. 729-37.
 87. Zafra-Stone, S., et al., *Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention*. Mol Nutr Food Res, 2007. **51**(6): p. 675-83.
 88. He, Y.H., et al., *[Antioxidant and anti-inflammatory effects of cyanidin from cherries on rat adjuvant-induced arthritis]*. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 2005. **30**(20): p. 1602-5.
 89. Xu, J.W., K. Ikeda, and Y. Yamori, *Inhibitory effect of polyphenol cyanidin on TNF-alpha-induced apoptosis through multiple signaling pathways in endothelial cells*. Atherosclerosis, 2007. **193**(2): p. 299-308.
 90. Oak, M.H., et al., *Delphinidin and cyanidin inhibit PDGF(AB)-induced VEGF release in vascular smooth muscle cells by preventing activation of p38 MAPK and JNK*. Br J Pharmacol, 2006. **149**(3): p. 283-90.

91. Choy, J.C., et al., *Endothelial cell apoptosis: biochemical characteristics and potential implications for atherosclerosis*. J Mol Cell Cardiol, 2001. **33**(9): p. 1673-90.
92. Martin, S., et al., *Delphinidin inhibits endothelial cell proliferation and cell cycle progression through a transient activation of ERK-1/-2*. Biochem Pharmacol, 2003. **65**(4): p. 669-75.
93. Martin, S., et al., *Delphinidin, an active compound of red wine, inhibits endothelial cell apoptosis via nitric oxide pathway and regulation of calcium homeostasis*. Br J Pharmacol, 2003. **139**(6): p. 1095-102.
94. Chen, C.Y., et al., *Delphinidin attenuates stress injury induced by oxidized low-density lipoprotein in human umbilical vein endothelial cells*. Chem Biol Interact. **183**(1): p. 105-12.
95. Saura-Calixto, F., *Dietary fiber as a carrier of dietary antioxidants: an essential physiological function*. J Agric Food Chem. **59**(1): p. 43-9.
96. Paredes-Lopez, O., et al., *Berries: improving human health and healthy aging, and promoting quality life--a review*. Plant Foods Hum Nutr, 2010. **65**(3): p. 299-308.
97. McGhie, T.K. and M.C. Walton, *The bioavailability and absorption of anthocyanins: towards a better understanding*. Mol Nutr Food Res, 2007. **51**(6): p. 702-13.
98. Konishi, Y., Y. Hitomi, and E. Yoshioka, *Intestinal absorption of p-coumaric and gallic acids in rats after oral administration*. J Agric Food Chem, 2004. **52**(9): p. 2527-32.
99. Lei, F., et al., *Pharmacokinetic study of ellagic acid in rat after oral administration of pomegranate leaf extract*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2003. **796**(1): p. 189-94.
100. Lafay, S. and A. Gil-Izquierdo, *Bioavailability of phenolic acids*. Phytochem Rev, 2008. **7**(2): p. 301-311.
101. Nielsen, I.L., et al., *Absorption and excretion of black currant anthocyanins in humans and watanabe heritable hyperlipidemic rabbits*. J Agric Food Chem, 2003. **51**(9): p. 2813-20.
102. Wu, X., H.E. Pittman, 3rd, and R.L. Prior, *Pelargonidin is absorbed and metabolized differently than cyanidin after marionberry consumption in pigs*. J Nutr, 2004. **134**(10): p. 2603-10.
103. Walton, M.C., et al., *Anthocyanin absorption and antioxidant status in pigs*. J Agric Food Chem, 2006. **54**(20): p. 7940-6.
104. Scalbert, A. and G. Williamson, *Dietary intake and bioavailability of polyphenols*. J Nutr, 2000. **130**(8S Suppl): p. 2073S-85S.
105. Cao, G., et al., *Anthocyanins are absorbed in glycosylated forms in elderly women: a pharmacokinetic study*. Am J Clin Nutr, 2001. **73**(5): p. 920-6.
106. Cao, G. and R.L. Prior, *Anthocyanins are detected in human plasma after oral administration of an elderberry extract*. Clin Chem, 1999. **45**(4): p. 574-6.
107. Milbury, P.E., et al., *Bioavailability of elderberry anthocyanins*. Mech Ageing Dev, 2002. **123**(8): p. 997-1006.
108. Cartron, E., et al., *Red-wine beneficial long-term effect on lipids but not on antioxidant characteristics in plasma in a study comparing three types of wine--description of two O-methylated derivatives of gallic acid in humans*. Free Radic Res, 2003. **37**(9): p. 1021-35.
109. Kay, C.D., et al., *Anthocyanin metabolites in human urine and serum*. Br J Nutr, 2004. **91**(6): p. 933-42.

110. Lapidot, T., et al., *Bioavailability of red wine anthocyanins as detected in human urine*. J Agric Food Chem, 1998. **46**(10): p. 4297-4302.
111. Frank, T., et al., *Bioavailability of anthocyanidin-3-glucosides following consumption of red wine and red grape juice*. Can J Physiol Pharmacol, 2003. **81**(5): p. 423-35.
112. Murkovic, M., U. Adam, and W. Pfannhauser, *Analysis of anthocyan glycosides in human serum*. Fresenius J Anal Chem, 2000. **366**(4): p. 379-81.
113. Mulleder, U., M. Murkovic, and W. Pfannhauser, *Urinary excretion of cyanidin glycosides*. J Biochem Biophys Methods, 2002. **53**(1-3): p. 61-6.
114. Wu, X., G. Cao, and R.L. Prior, *Absorption and metabolism of anthocyanins in elderly women after consumption of elderberry or blueberry*. J Nutr, 2002. **132**(7): p. 1865-71.
115. Matsumoto, H., et al., *Orally administered delphinidin 3-rutinoside and cyanidin 3-rutinoside are directly absorbed in rats and humans and appear in the blood as the intact forms*. J Agric Food Chem, 2001. **49**(3): p. 1546-51.
116. Netzel, M., et al., *Bioactive anthocyanins detected in human urine after ingestion of blackcurrant juice*. J Environ Pathol Toxicol Oncol, 2001. **20**(2): p. 89-95.
117. McGhie, T.K., et al., *Anthocyanin glycosides from berry fruit are absorbed and excreted unmetabolized by both humans and rats*. J Agric Food Chem, 2003. **51**(16): p. 4539-48.
118. Mazza, G., et al., *Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects*. J Agric Food Chem, 2002. **50**(26): p. 7731-7.
119. Felgines, C., et al., *Blackberry anthocyanins are mainly recovered from urine as methylated and glucuronidated conjugates in humans*. J Agric Food Chem, 2005. **53**(20): p. 7721-7.
120. Felgines, C., et al., *Strawberry anthocyanins are recovered in urine as glucuro- and sulfoconjugates in humans*. J Nutr, 2003. **133**(5): p. 1296-301.
121. Youdim, K.A., A. Martin, and J.A. Joseph, *Incorporation of the elderberry anthocyanins by endothelial cells increases protection against oxidative stress*. Free Radic Biol Med, 2000. **29**(1): p. 51-60.
122. Yi, W., et al., *Absorption of anthocyanins from blueberry extracts by caco-2 human intestinal cell monolayers*. J Agric Food Chem, 2006. **54**(15): p. 5651-8.
123. Ichiyanagi, T., et al., *Bioavailability and tissue distribution of anthocyanins in bilberry (Vaccinium myrtillus L.) extract in rats*. J Agric Food Chem, 2006. **54**(18): p. 6578-87.
124. Bub, A., et al., *Malvidin-3-glucoside bioavailability in humans after ingestion of red wine, dealcoholized red wine and red grape juice*. Eur J Nutr, 2001. **40**(3): p. 113-20.
125. Passamonti, S., et al., *Fast access of some grape pigments to the brain*. J Agric Food Chem, 2005. **53**(18): p. 7029-34.
126. Talavera, S., et al., *Anthocyanins are efficiently absorbed from the stomach in anesthetized rats*. J Nutr, 2003. **133**(12): p. 4178-82.
127. Passamonti, S., et al., *The stomach as a site for anthocyanins absorption from food*. FEBS Lett, 2003. **544**(1-3): p. 210-3.
128. Passamonti, S., U. Vrhovsek, and F. Mattivi, *The interaction of anthocyanins with bilansinase*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **296**(3): p. 631-6.
129. Baldini, G., et al., *Cellular localization of sulfobromophthalein transport activity in rat liver*. Biochim Biophys Acta, 1986. **856**(1): p. 1-10.

130. Battiston, L., et al., *Specific sequence-directed anti-bilitranslocase antibodies as a tool to detect potentially bilirubin-binding proteins in different tissues of the rat*. FEBS Lett, 1999. **453**(3): p. 351-5.
131. Talavera, S., et al., *Anthocyanins are efficiently absorbed from the small intestine in rats*. J Nutr, 2004. **134**(9): p. 2275-9.
132. Matuschek, M.C., et al., *The jejunum is the main site of absorption for anthocyanins in mice*. J Nutr Biochem, 2006. **17**(1): p. 31-6.
133. Walton, M.C., et al., *The flavonol quercetin-3-glucoside inhibits cyanidin-3-glucoside absorption in vitro*. J Agric Food Chem, 2006. **54**(13): p. 4913-20.
134. Wu, X., H.E. Pittman, 3rd, and R.L. Prior, *Fate of anthocyanins and antioxidant capacity in contents of the gastrointestinal tract of weanling pigs following black raspberry consumption*. J Agric Food Chem, 2006. **54**(2): p. 583-9.
135. McDougall, G.J., et al., *Anthocyanin-flavanol condensation products from black currant (*Ribes nigrum* L.)*. J Agric Food Chem, 2005. **53**(20): p. 7878-85.
136. McDougall, G.J., et al., *Assessing potential bioavailability of raspberry anthocyanins using an in vitro digestion system*. J Agric Food Chem, 2005. **53**(15): p. 5896-904.
137. McDougall, G.J., et al., *Anthocyanins from red wine--their stability under simulated gastrointestinal digestion*. Phytochemistry, 2005. **66**(21): p. 2540-8.
138. Seeram, N.P., L.D. Bourquin, and M.G. Nair, *Degradation products of cyanidin glycosides from tart cherries and their bioactivities*. J Agric Food Chem, 2001. **49**(10): p. 4924-9.
139. Keppler, K. and H.U. Humpf, *Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora*. Bioorg Med Chem, 2005. **13**(17): p. 5195-205.
140. Aura, A.M., et al., *In vitro metabolism of anthocyanins by human gut microflora*. Eur J Nutr, 2005. **44**(3): p. 133-42.
141. Fleschhut, J., et al., *Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro*. Eur J Nutr, 2006. **45**(1): p. 7-18.
142. Williamson, G. and M.N. Clifford, *Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity?* British Journal of Nutrition, 2010. **104**: p. S48-S66.
143. Tsuda, T., F. Horio, and T. Osawa, *Absorption and metabolism of cyanidin 3-O-beta-D-glucoside in rats*. FEBS Lett, 1999. **449**(2-3): p. 179-82.
144. Gonzalez-Barrio, R., et al., *Bioavailability of anthocyanins and ellagitannins following consumption of raspberries by healthy humans and subjects with an ileostomy*. J Agric Food Chem, 2010. **58**(7): p. 3933-9.
145. Kahle, K., et al., *Studies on apple and blueberry fruit constituents: do the polyphenols reach the colon after ingestion?* Mol. Nutr. Food Res., 2006. **50**: p. 418-423.
146. Crozier, A., D. Del Rio, and M.N. Clifford, *Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds*. Mol Aspects Med. **31**(6): p. 446-67.
147. Bors, B., *Blue Honeysuckle*. Vol. 2007. 2007, http://www.usask.ca/agriculture/plantsci/dom_fruit/articles/blue_honeysuckle.pdf, staženo 17.2.
148. Jin, X.H., et al., *Effects of blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.) extract on lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo*. Exp Eye Res, 2006. **82**(5): p. 860-7.

149. Duthie, S.J., et al., *The effects of cranberry juice consumption on antioxidant status and biomarkers relating to heart disease and cancer in healthy human volunteers.* Eur. J. Nutr., 2006. **45**(2): p. 113-122.
150. Neto, C.C., *Cranberry and blueberry: evidence for protective effects against cancer and vascular diseases.* Mol. Nutr. Food Res., 2007. **51**(6): p. 652-64.
151. Svarcova, I., Valentova, K., Ulrichova, J., Simanek, V. *Antioxidant activity of phenolic fraction from Lonicera caerulea L. var. kamschatica berries.* in XXIV. Xenobiochemicke sympozium. 2007. Liptovsky Jan.
152. Palikova, I., et al., *Protectivity of Blue Honeysuckle Extract against Oxidative Human Endothelial Cells and Rat Hepatocyte Damage.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. **57**(15): p. 6584-6589.
153. Yoshizawa, Y., et al., *Differentiation-inducing effects of small fruit juices on HL-60 leukemic cells.* J Agric Food Chem, 2000. **48**(8): p. 3177-82.
154. Tarozzi, A., et al., *Protective effects of cyanidin-3-O-beta-glucopyranoside against UVA-induced oxidative stress in human keratinocytes.* Photochem Photobiol, 2005. **81**(3): p. 623-9.
155. Svobodova, A., et al., *Protective effects of phenolic fraction of blue honeysuckle fruits against UVA-induced damage to human keratinocytes.* Arch Dermatol Res, 2008. **300**(5): p. 225-33.
156. Svobodova, A., A. Zdarilova, and J. Vostalova, *Lonicera caerulea and Vaccinium myrtillus fruit polyphenols protect HaCaT keratinocytes against UVB-induced phototoxic stress and DNA damage.* J Dermatol Sci, 2009. **56**(3): p. 196-204.
157. Gruia, M.I., et al., *The antioxidant response induced by Lonicera caerulea berry extracts in animals bearing experimental solid tumors.* Molecules, 2008. **13**(5): p. 1195-206.
158. Psotová, J., et al., *Safety assesment of sanguiritrin, alkaloid fraction of Macleaya cordata, in rats.* Vet. Med.-Czech, 2006. **51**: p. 145-155.
159. Sedlak, J. and R.H. Lindsay, *Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent.* Anal Biochem, 1968. **25**(1): p. 192-205.
160. Hu, M.L., *Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma.* Methods Enzymol. Vol. 233 1994, New York: Academic Press. 380-5.
161. Ewing, J.F. and D.R. Janero, *Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator.* Anal Biochem, 1995. **232**(2): p. 243-8.
162. Tappel, A.L., *Glutathione peroxidase and hydroperoxides.* Methods Enzymol. Vol. 52. 1978. 506-13.
163. Beers, R.F. and S. I.W., *A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase.* J Biol Chem, 1952. **195**: p. 133-140.
164. Carlberg, I. and B. Mannervik, *Glutathione reductase.* Methods Enzymol., ed. A. Meister. Vol. 113. 1985, New York: Academic Press. 484-490.
165. Meister, A., *Glutathione metabolism and its selective modification.* J Biol Chem, 1988. **263**(33): p. 17205-17208.
166. Warholm, M., et al., *Glutathione transferases from human liver,* in *Methods Enzymol*, A. Meister, Editor 1985. p. 499-504.
167. Evelyn, K.A. and H.T. Malloy, *Micro determination of oxyhemoglobin, methemoglobin and sulphemoglobin in a single sample of blood.* J Biol Chem, 1938. **126**: p. 655-662.
168. Bradford, M., *A rapid and sensitive method for the qauntification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding.* Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.

169. Reichenbach, R., J. Ulrichova, and V. Kren, *Závěrečná zpráva o řešení projektu v programu TANDEM*, 2010, Ministerstvo průmyslu a obchodu ČR.
170. Palikova, I., *Biologická aktivita bobulovitých plodin Lonicera caerulea L. a Vaccinium macrocarpon Ait. Disertační práce*, 2008, Universita Palackého: Olomouc.
171. Palikova, I., et al., *Constituents and antimicrobial properties of blue honeysuckle: a novel source for phenolic antioxidants*. J Agric Food Chem, 2008. **56**(24): p. 11883-9.
172. Nakajima, J.I., et al., *LC/PDA/ESI-MS Profiling and Radical Scavenging Activity of Anthocyanins in Various Berries*. J Biomed Biotechnol, 2004. **2004**(5): p. 241-247.
173. Hassimotto, N.M., S. Pinto Mda, and F.M. Lajolo, *Antioxidant status in humans after consumption of blackberry (Rubus fruticosus L.) juices with and without defatted milk*. J Agric Food Chem, 2008. **56**(24): p. 11727-33.
174. Palikova, I., et al., *Protectivity of blue honeysuckle extract against oxidative human endothelial cells and rat hepatocyte damage*. J Agric Food Chem, 2009. **57**(15): p. 6584-9.
175. Hassimotto, N.M.A. and F.M. Lajolo, *Antioxidant status in rats after long-term intake of anthocyanins and ellagitannins from blackberries*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2011. **91**(3): p. 523-531.
176. Kowalczyk, E., et al., *[The influence of anthocyanins from Aronia melanocarpa on selected parameters of oxidative stress and microelements contents in men with hypercholesterolemia]*. Pol Merkur Lekarski, 2005. **19**(113): p. 651-3.
177. Day, B.J., *Catalase and glutathione peroxidase mimics*. Biochem Pharmacol, 2009. **77**(3): p. 285-96.
178. Dragsted, L.O., et al., *The 6-a-day study: effects of fruit and vegetables on markers of oxidative stress and antioxidative defense in healthy nonsmokers*. Am J Clin Nutr, 2004. **79**(6): p. 1060-72.
179. Koren, E., R. Kohen, and I. Ginsburg, *Polyphenols enhance total oxidant-scavenging capacities of human blood by binding to red blood cells*. Exp Biol Med (Maywood), 2010. **235**(6): p. 689-99.
180. Psotova, J., J. Lasovsky, and J. Vicar, *Metal-chelating properties, electrochemical behavior, scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolics*. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2003. **147**(2): p. 147-53.
181. Babich, H., A. Sedletcaia, and B. Kenigsberg, *In vitro cytotoxicity of protocatechuic acid to cultured human cells from oral tissue: involvement in oxidative stress*. Pharmacol Toxicol, 2002. **91**(5): p. 245-53.
182. Kalousova, M., et al., *Advanced glycoxidation end products in chronic diseases-clinical chemistry and genetic background*. Mutat Res, 2005. **579**(1-2): p. 37-46.
183. Valentova, K., et al., *Biosafety, antioxidant status, and metabolites in urine after consumption of dried cranberry juice in healthy women: a pilot double-blind placebo-controlled trial*. J Agric Food Chem, 2007. **55**(8): p. 3217-24.
184. Forester, S.C. and A.L. Waterhouse, *Metabolites are key to understanding health effects of wine polyphenolics*. J Nutr, 2009. **139**(9): p. 1824S-31S.
185. Nurmi, T., et al., *Metabolism of berry anthocyanins to phenolic acids in humans*. J Agric Food Chem, 2009. **57**(6): p. 2274-81.
186. Gonthier, M.P., et al., *Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats*. J Nutr, 2003. **133**(6): p. 1853-9.
187. Monteiro, M., et al., *Chlorogenic acid compounds from coffee are differentially absorbed and metabolized in humans*. J Nutr, 2007. **137**(10): p. 2196-201.