

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMAKOGNOSIE**

RIGORÓZNÍ PRÁCE

**Obsah antokyanů v plodech bezu černého a jejich
biologická aktivita**

Konzultant: Doc. RNDr. Jiřina Spilková, CSc.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2015

EVA LEHAROVÁ

Poděkování

Ráda bych poděkovala docentce Jiřině Spilkové za její ochotu, vstřícnost a všechny cenné rady, které mi poskytla při psaní této práce.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 11. 2. 2015

1. OBSAH

1. OBSAH	5
2. ABSTRAKT	7
3. ABSTRACT	8
4. ÚVOD	10
5. CÍL PRÁCE	12
6. TEORETICKÁ ČÁST	13
6.1. <i>SAMBUCUS NIGRA</i> L. (ADOXACEAE)– BEZ ČERNÝ.....	13
6.2. PĚSTOVÁNÍ ČERNÉHO BEZU	14
6.3. OBSAHOVÉ LÁTKY PLODŮ ČERNÉHO BEZU <i>SAMBUCUS NIGRA</i>	16
6.3.1. <i>Antokyany</i>	17
6.4. BIOLOGICKÉ ÚČINKY ANTOKYANŮ.....	18
6.4.1. <i>Protizánětlivé účinky</i>	18
6.4.2. <i>Kardiovaskulární systém</i>	19
6.4.3. <i>Kostní tkáň</i>	20
6.4.4. <i>Protiinfekční, protivirové a protibakteriální účinky</i>	21
6.4.5. <i>Antioxidační účinky</i>	22
6.4.6. <i>Neuroprotektivní efekt</i>	23
6.4.7. <i>Diabetes mellitus, obezita a metabolický syndrom</i>	24
6.4.8. <i>Zrak</i>	26
6.4.9. <i>Chemoprotektivní působení</i>	26
6.5. ALERGIE NA ČERNÝ BEZ.....	28
6.6. VLIV ZPŮSOBU ZPRACOVÁNÍ PLODŮ S OBSAHEM AC NA BIOLOGICKÉ ÚČINKY	29
6.6.1. <i>Volba podmínek extrakce</i>	29
6.6.2. <i>Zpracování plodů</i>	30
6.7. METABOLISMUS U ČLOVĚKA	33
6.7.1. <i>Farmakokinetický profil u člověka</i>	34
6.7.2. <i>Role střevní mikrobioty v biodostupnosti a biologické aktivitě antokyanů</i>	36
6.7.3. <i>Metabolity</i>	37
7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	40
7.1. POUŽITÝ MATERIÁL.....	40
7.2. PŘÍSTROJE	41
7.3. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	41
7.4. POSTUP STANOVENÍ OBSAHU ANTOKYANŮ V PLODECH.....	41
7.5. ZTRÁTA SUŠENÍM	42

8.	VÝSLEDKY	43
8.1.	ZTRÁTA SUŠENÍM	43
8.2.	OBSAH ANTOKYANŮ V PLODECH - KULTURNÍ ODRŮDY BEZU	44
8.3.	SROVNÁNÍ SBĚRU 2011 A 2013	50
8.4.	OBSAH ANTOKYANŮ V PLODECH - PLANÝ BEZ	52
9.	DISKUZE	57
10.	ZÁVĚR	61
11.	POUŽITÉ ZKRATKY	63
12.	POUŽITÁ LITERATURA	65

2. ABSTRAKT

Plody černého bezu *Sambucus nigra* L. obsahují řadu biologicky aktivních látek, z nichž nejdůležitější jsou antokyany. Tato ve vodě rozpustná barviva vykazují silnou antioxidační aktivitu, která by mohla být využita v terapii kardiovaskulárních, metabolických nebo nádorových onemocnění. Dále byly zjištěny účinky protizánětlivé, antibakteriální a antivirové a také příznivé působení na nervovou soustavu. Plody dále obsahují flavonoidy, organické kyseliny a další látky. V současné době jsou předmětem výzkumu především kulturní šlechtěné odrůdy bezu, které se oproti planým bezům vyznačují vyšší výnosovostí a nižším obsahem nežádoucích alkaloidů v plodech.

Cílem této práce bylo stanovit obsah antokyanů v plodech sedmnácti vybraných pěstovaných kultivarů bezu černého (*Sambucus nigra* L.) a podat přehled nových poznatků o jejich biologické aktivitě a metabolismu u člověka. Dále stanovit obsah antokyanů ve vzorcích plodů planého bezu během jejich postupného dozrávání.

Obsah antokyanů byl stanoven spektrofotometricky ve výluhu připraveném ze zmrazených plodů. Obsah byl vyjádřen v procentech jako cyanidin-3-*O*-glukosidchlorid a přepočten na vysušenou drogu. Bylo zjištěno, že kulturní odrůdy bezu obsahují vyšší množství antokyanů než bez planý a že se jednotlivé kultivary obsahem liší. Mezi nejbohatší odrůdy patřily Samdal (5,9% přepočteno na vysušenou drogu) a Samyl (5,1% přepočteno na vysušenou drogu). Mezi kultivary s nejnižším obsahem antokyanů patřily Pregarten (1,7%), Dana (1,79%), Weihenstephan (1,89%) a Albida, která se vyznačuje téměř bezbarvými plody. Obsah antokyanů se u většiny ostatních plodů pohyboval mezi 2% a 5% při přepočtení na vysušenou drogu.

Planý černý bez se vyskytuje na nejrůznějších stanovištích, což může mít vliv na kvalitu plodů a množství obsahových látek. V současné době se odborníci zabývají pěstováním kulturních odrůd, a to především podmínkami pěstování. Zkoumány jsou nároky na stanoviště, výsadba, tvarování a řez rostlin, výživa a ochrana, údržba meziřadí a následně výnosnost a sklizeň. Plody z pěstovaných rostlin bohaté na obsah antokyanů by se mohly stát zdrojem kvalitní drogy *Sambuci fructus*, využitelné v medicíně a farmacii pro biologické účinky obsahových látek.

3. ABSTRACT

The elderberry fruit (*Sambucus nigra* L.) contains many biologically active compounds. The anthocyanins are said to be the most important. Anthocyanins are colourants soluble in water and they exhibit a strong antioxidant activity. This could be used for treating cardiovascular, metabolic or cancer diseases. Antiinflammatory, antibacterial and antiviral effects were also detected as well as the beneficial effects for nervous system. The fruit also contains flavonoids, organic acids and other substances. The cultivated cultivars are currently the main subject of research – they are characterized by higher yield and lower content of unwanted alkaloids in fruit than it is found in the wild plants.

The aim of this work was to determinate the content of anthocyanins in the fruits of 17 selected cultivars of elderberry (*Sambucus nigra* L.) and to give a summary of the new findings about their biological activity and metabolism in human. I also aimed to determinate the content of anthocyanins in the samples from the wild plants during the ripening.

The content of anthocyanins was determined by spectrophotometry in the extract which was prepared from the frozen fruit. The content was expressed in a percentage as a cyanidin-3-*O*-glucoside-chloride and it was converted to the dried fruit. It was found out that the cultivars contain more anthocyanins than the wild fruit and that the content of anthocyanins is different in each cultivar. Cultivar Samdal (5,9% of anthocyanins converted to the dried fruit) and cultivar Samyl (5,1% converted to the dried fruit) were the richest from all of the compared cultivars. Cultivars Pregarten (1,7%), Dana (1,79%), Weihenstephan (1,89%) and Albida, which is characterized by almost colorless fruit, were the cultivars with the lowest content of anthocyanins in fruit. The content of anthocyanins (calculated to the dried fruit) ranged in other cultivars from 2% to 5% .

The wild elderberry occurs at various habitats, the site of occurrence can have an influence on the quality of fruit and on the amount of contained substances. Currently the experts deal with the growing of cultivars, especially with the conditions of cultivation. The site requirements, plantation, cutting of plants, nutrition, protection and maintenance of area followed by yield and harvest are the most important subjects of interest. The fruits from cultivated plants which are rich in anthocyanins could become

the quality drug *Sambuci fructus* that could be used in medicine and pharmacy for the biological effects of the compounds contained.

4. ÚVOD

Antokyany

Antokyany jsou rostlinné polyfenoly, které mají společný biogenetický původ s flavonoidy. Jsou to rostlinná barviva rozpustná ve vodě, zodpovědná za charakteristická zbarvení květů, plodů a listů rostlin. Vyskytují se ve většině rostlin a zabarvují je všemi barvami od žluté až po vínovou. Název pochází z řeckých slov *anthos* (květina) a *kyanos* (modrá).

Jedná se o sekundární metabolity rostlin a není dosud úplně jasné, proč je rostliny tvoří. Diskutuje se, že květy nejspíše díky těmto atraktivním pigmentům vábí hmyz a opylovače. Barevné plody upoutávají pozornost zvířat, která je snědí a roznesou semena plodů. V plodech slouží antokyany také jako indikátory fáze zrání. Ve vegetativních tkáních (především listech) není jejich funkce zatím jasná. Diskutuje se především možnost, že díky své antioxidační aktivitě chrání fotosyntetický aparát před oxidativním stresem.

Antokyany absorbují viditelné i UV záření a chrání tak buňky před jejich poškozením. Působí antioxidačně, jsou schopny vychtávat volné radikály a tím chránit před oxidativním stresem.

Základním chromoforem antokyaninů je 7-hydroxyflavyliový ion. Přirozeně se vyskytující antokyany mají obvykle hydroxylový OH substituent v poloze 3. Tento hydroxyl je vždy glykosylovaný, což zajišťuje tepelnou stabilitu (aglykony se nazývají antokyanidiny). Další hydroxyl je v poloze 5 (někdy glykosylovaný). 2-fenylový kruh (kruh B) je substituován jednou nebo více hydroxy- nebo metoxy- skupinami. V literatuře byly popsány stovky odlišných struktur, které se liší především substitucí na kruhu B a dále cukernou složkou.

Ve vodných roztocích existují v různých formách v závislosti na pH. V kyselém pH <2 existují převážně jako červený flavyliový kationt. Při zvýšení pH se část mění na modrou chinoidní bázi (deprotonace). Při pH >3 je většina kationtů přeměněna hydratací na bezbarvý karbinol (pseudobáze) a pak bezbarvý chalkon (otevření kruhu). Nejstabilnější jsou tedy antokyany v nízkém pH <3.

V současné době jsou antokyany předmětem výzkumu především díky svým příznivým účinkům na lidské zdraví a možnému uplatnění v medicíně a farmacii.

Antokyany vykazují silnou antioxidační aktivitu, která by mohla být uplatněna v léčbě kardiovaskulárních či metabolických chorob (obezita, diabetes mellitus a metabolický syndrom). Dále bylo zjištěno působení protizánětlivé a protiinfekční, a to jak u onemocnění virových, tak bakteriálních. Využity by mohly být i účinky imunostimulační. Nově je diskutováno také příznivé působení na kostní tkáň a nervovou soustavu. Nelze opomenout ani účinky chemoprotektivní.

Antokyany jsou hlavními obsahovými látkami tmavého drobnoplodého ovoce. Vysoký obsah byl nalezen například v odrůdách bezu, aronie, malinách, ostružinách, borůvkách, v černém a červeném rybízu nebo jahodách. V popředí zájmu odborníků stojí celkové množství těchto sloučenin v jednotlivých plodech, jejich biologické účinky a dále způsob zpracování plodů ve smyslu získání co nevíce stabilních extraktů se zachovanými účinky obsahových látek. Ve studiích na zvířatech i lidech je zkoumán farmakokinetický profil antokyanů (absorpce, distribuce, metabolismus a eliminace), sledována biodostupnost těchto sloučenin a identifikovány jednotlivé metabolity.

5. CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo stanovit obsah antokyanů v plodech vybraných pěstovaných kultivarů bezu černého (*Sambucus nigra* L.) a podat přehled nových poznatků o jejich biologické aktivitě a metabolismu u člověka. Dále porovnat obsah antokyanů v plodech pěstovaných a sklizených v roce 2011 s plody ze sklizně v roce 2013. Dalším cílem bylo zjistit obsah antokyanů v plodech planého bezu během postupného dozrávání plodů.

6. TEORETICKÁ ČÁST

6.1. *Sambucus nigra* L. (Adoxaceae)– bez černý

Černý bez je bohatě větvený keř nebo i strom, vysoký 1,5 až 5 metrů. V České republice je významně rozšířený po celém území, nevyskytuje se jen v nejvyšších polohách. Setkáme se s ním nejen na pasekách, okrajích lesů a křovinatých porostech, ale i v obcích na sídlištích, podél plotů, zdí, cest a silnic.

Větve mají v mládí barvu zelenou nebo šedozelenou, bývají lysé, s početnými tmavými lenticelami. Starší větve jsou tmavší, s nepravidelně rozbrázděnou borkou. Pupeny jsou vejcovité, v dolní polovině kryté šupinami. Listy lichozpeřené, čepel eliptická nebo vejčitá; lístky spíše kopinaté, mnohdy asymetrické, okraje mají pilovitě zubaté a svrchní stranu olýsalou až lysou, po rozemnutí nepříjemně páchnou. Květenství je chocholičnaté, květy jsou uspořádané v hustých, mnohokvětých většinou 3-5ramenných plochých vrcholících. Koruna je barvy bílé nebo slabě nažloutlé. Plodenství nicí, peckovice tmavé až černé, kulovitého tvaru. [1]

Černý bez byl jako léčivá bylina využíván už léčiteli starého Řecka a Říma. Ve středověku byl považován za bylinu čarovnou, kouzelnou, někdy i posvátnou. Zmínka o tomto keři je v mnoha herbářích a bylinářích, uveden je například i ve slavném Matthioliho herbáři. V lidové léčbě však nejsou zmiňovány plody - bezinky, ale hlavně květy, kořeny a kůra. Využití plodů je až novějšího původu. V potravinářství se bezinky zpracovávají na ovocné šťávy, džemy a povidla, kompoty a alkoholické nápoje. Využívají se také jako zdroj přírodních potravinářských barviv – antokyanů. Plody obsahují řadu biologicky účinných látek, nejdůležitější jsou antokyany. [2,3]

Pro farmaceutické využití poskytuje černý bez drogu *Sambuci nigrae flos*, která je uvedena v platném lékopise, a *Sambuci fructus*.

6.2. Pěstování černého bezu

Druhy rodu *Sambucus* jsou přirozeně rozšířené nebo introdukované ve všech oblastech celého světa, vyskytují se nejen v mírném podnebném pásu, ale i v subtropích. Bezu vyhovují půdy neutrální, spíše humózní, kypré, zásobené živinami a především dusíkem. Stanoviště by mělo být plně osluněné, pozemek rovný, nejsou vhodné silně větrné polohy. Během vegetace je důležitý vyrovnaný srážkový režim s celoročním průměrem nad 600 mm nebo až 700 mm. Fáze kvetení nastává v Česku v závislosti na genotypu a lokalitě v druhé polovině května až na začátku června, díky tomu bez v podstatě uniká pozdním jarním mrazům. Opylování nezávisí na včelách. Zralé plody se u nás sklízí od počátku srpna do poloviny října. Kulturní odrůdy bezů se oproti planým bezům vyznačují vyšší výnosovostí a nižším obsahem potravinářsky nežádoucích alkaloidů v plodech. Rozdíly mezi jednotlivými odrůdami jsou významné především z hlediska výnosového potenciálu, křivky plodnosti, odolnosti dřevin, doby zrání, chemického složení plodů, schopnosti rovnoměrného dozrávání, sensorického hodnocení, a také podle účelu zpracování bezinek. [4]

Na našem území je černý bez původním ovocným druhem, donedávna se zde ale téměř nepěstoval a dosud zde nebyly vyšlechtěny žádné kulturní odrůdy. Podmínky pro pěstování jsou ale vhodné na většině našeho území. Výzkumem a šlechtěním černého bezu pro využití v ovocnářské praxi se zabývají pracovníci Výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského Holovousy, s.r.o. a byla již vytvořena metodika, jejímž cílem je předložit technologii pěstování, hodnocení a množení zkoumaných dovezených odrůd černého bezu a doporučit nejvhodnější odrůdy pro pěstování v České republice. [4]

Většina odrůd černého bezu používaná pro ovocnářské účely pochází z Dánska a Rakouska, tyto země začaly selektovat přírodní genotypy a pěstovat bez v kulturách již v polovině dvacátého století. Další významnou zemí pěstující černý bez je Maďarsko, v Německu převažují sady v bioprodukci. Na Slovensku jsou tržně pěstovány 4 odrůdy a nedávno se černý bez začal komerčně pěstovat i v Polsku. [5]

Mimo Evropu se pěstují odrůdy příbuzného bezu kanadského v Kanadě a USA. [5]

3 kultivary amerického bezu *Sambucus canadensis* byly studovány za účelem zjištění odpovědi rostliny na odlišné metody prořezávání. [6] Studie trvajících 5 let zahrnovala 4 odlišné metody prořezávání: 1) každoroční prořezávání rostliny až k půdě na jaře, 2) prořezávání k půdě každé druhé jaro (ob rok), 3) každoroční selektivní prořezávání - odstranění starých, neproduktivních nebo málo kvalitních větví a 4) bez prořezávání. Přestože interpretace výsledů byla poměrně náročná, několik trendů bylo evidentních. Každoroční selektivní prořezávání bylo výbornou cestou k získání bezinek s průměrnými výnosy 1086 g na rostlinu ve všech parametrech, avšak prořezávání k půdě každoročně nebo ob rok vedlo také k uspokojivým výnosům (855, respektive 1085 g na rostlinu). Rostliny prořezávané k půdě vytvářely postupně méně vrcholůků, ale zato byly rozsáhlejší, než u rostlin selektivně prořezávaných nebo neprořezávaných, což může být důležité z hlediska efektivity sklizně. Způsob prořezávání obecně ovlivnil dobu kvetení a zrání ovoce. Rostliny, které kvetly pouze na nových výhoncích (po odejmutí všech výhonků) měly ovoce zralé o 14 až 21 dnů později než rostliny, které plodily na starém dřevě. Ačkoli každoročně prořezávané rostliny poskytly obecně menší výtěžek, zůstaly silné a produktivní. Tato technika by tedy mohla mít mnohé výhody oproti jiným metodám. Stále však zůstávají nezodpovězené otázky ohledně dlouhodobých důsledků prořezávání. [6]

6.3. Obsahové látky plodů černého bezu *Sambucus nigra*

Fytochemickým složením plodů černého bezu *Sambucus nigra* jsem se podrobněji zabývala již ve své diplomové práci [7], zde uvádím jen stručnější přehled obsahových látek plodů. Zastoupení obsahových látek se u jednotlivých kultivarů liší. [8] V dnešní době již bylo vyšlechtěno mnoho kultivarů s odlišným fytochemickým složením plodů a tím i rozdílnými biologickými účinky.

Plody černého bezu jsou bohaté především na antokyany a jiné polyfenoly. Dále obsahují cukry, organické kyseliny, silici, vitaminy A, B₁, B₂, B₆ a C, kyselinu listovou; třísloviny (3%), aminokyseliny, draslík, vápník a fosfor. [9] Zjištěna byla také přítomnost melatoninu, což je původně živočišný hormon. [10] Plody *Sambucus ebulus* obsahují kromě antokyanů také lektiny (ebulin f a SELfd), které vykazují homologii sekvence aminokyselin s alergenem Sam n1 z pylu a plodů *Sambucus nigra*. Lektiny jsou po perorální konzumaci toxické. [11]

Flavonoidy

Plody z planě rostoucích rostlin mají obecně vyšší obsah fenolických sloučenin než plody z rostlin pěstovaných. [12] S rostoucí nadmořskou výškou se narozdíl od antokyanů zvyšuje i koncentrace flavonoidů v plodech. [13]

Organické kyseliny

Nejhojnější organickou kyselinou byla ve všech porovnávaných odrůdách kyselina citrónová. V plodech bezu byly nalezeny také kyselina jablečná, fumarová a šikimová. [8] Dále se zjistilo, že v plodech je přítomna kyselina chlorogenová. [14] V různém množství se vyskytuje také kyselina vinná, šťavelová, jantarová a salicylová. [4]

Cukry

Z cukrů jsou plody nejbohatší na fruktózu a glukózu, v malém množství se vyskytuje ještě sacharóza. [8]

Kyanogenní glykosidy

V několika druzích *Sambucus* sp. byl nalezen kyanogenní glykosid (*S*)-sambunigrin. V *Sambucus nigra* byl nalezen ještě i (*R*)-prunasin a substituovaný (*R*)-holocalin a (*S*)-zierin. [14]

6.3.1. Antokyany

Antokyany jsou nejdůležitější skupinou obsahových látek plodů. Vyznačují se silnou antioxidační aktivitou a díky tomu vykazují mnoho příznivých účinků na zdraví člověka. Pro plody *Sambucus* sp. jsou bez ohledu na zbarvení plodů charakteristické deriváty cyanidinu (především glukosidy a dále deriváty obsahující xylózu), dále byly nalezeny glukosidy pelargonidinu a delphinidinu. [15] Srovnávací analýzou kultivarů Haschberg, Rubini, Selection 13, Selection 14 a Selection 25 byly kromě glukosidů cyanidinu identifikovány ještě cyanidin sambubiosid a rutinoid. [8]

Při zkoumání 4 druhů a 8 kříženců bezu bylo nalezeno a kvantifikováno 19 odlišných antokyanů. [16] Profil a obsah antokyanů se mezi druhy a kříženci značně lišil. V plodech *Sambucus nigra* byly nejhojnějšími cyanidin-3-O-sambubiosid a cyanidin-3-O-glukosid. V křížencích *Sambucus javanica* byl jako převládající antokyanin identifikován cyanidin-3-(*E*)-p-kumaroyl-sambubiosid-5-glukosid. Nejvyšší obsah celkových antokyanů byl určen v plodech mezidruhových kříženců *Sambucus javanica* x *Sambucus racemosa*, následován byl plody *Sambucus nigra*, kříženci (*Sambucus javanica* x *Sambucus nigra*) x cv. Black Beauty a (*Sambucus javanica* x *Sambucus nigra*) x *Sambucus cerulea*. Plody *Sambucus nigra* var. *viridis* obsahovaly výrazně nižší hladiny celkových antokyanů. Výsledky poskytují nové informace pro šlechtitelské programy, které usilují vytvoření nových kříženců nebo kultivarů se zvýšenými hladinami bioaktivních sloučenin. [16]

Množství antokyanů klesá s nadmořskou výškou [13] a je zřejmě závislé na odrůdě, zemědělských podmínkách a částečně i na teplotě a množství slunečního záření. [17]

6.4. Biologické účinky antokyanů

6.4.1. Protizánětlivé účinky

Účinky vodného extraktu připraveného ze dřeva, listů, květů a plodů *Sambucus palmensis*, endemického druhu vyskytujícího se na Kanárských ostrovech, byly hodnoceny na myších. V extraktu byla prokázána přítomnost tříslovin, flavonoidů a antokyanů. Výsledky ukázaly, že tento druh bezu má výrazný analgetický efekt, pravděpodobně spíše periferní než centrální, a dále vykazuje mírný protizánětlivý účinek. Uvedená data tedy podporují jeho široké využívání v tradiční i novodobé medicíně v léčbě bolesti a zánětu. [18]

Soubor antokyanů získaný z malin vykázal vysokou účinnost na potlačení syntézy oxidu dusnatého. [19] Protizánětlivé účinky se dále projeví snížením exprimovaných hladin indukibilní syntázy oxidu dusnatého, cyklooxygenázy 2, interleukinu-1 beta a interleukinu-6 v aktivovaných makrofázích. Antokyanová frakce z malin také potlačila signální cesty NF-kappa B a AP-1. Výsledky ukazují, že antokyaniny pocházející z malin zmírňují zánět *in vitro* i *in vivo* především inhibicí aktivace NF-kappa B a MAPkináz. [19]

Zdrojem antokyanů jsou plody borůvek, ostružin a černého rybízu. Byl porovnáván protizánětlivý účinek antokyanů z těchto plodů a sledován vztah mezi jejich antioxidační kapacitou a protizánětlivým efektem v makrofázích. [20] Jako hlavní antokyaniny obsahovaly plody malvidin-3-glukosid, cyanidin-3-glukosid a delphinidin-3-rutinosid. Ukázalo se, že protizánětlivý účinek v makrofázích je, alespoň částečně, způsoben inhibicí jaderné translokace nukleárního faktoru kappa B (NF-kappa B) nezávislé na cestách zprostředkovaných nukleárním faktorem NRF2. [20]

Studie *in vitro* naznačují, že antokyaniny mají protizánětlivý účinek, avšak informace ze studii *in vivo* jsou spíše vzácné a neprůkazné. Například antokyaniny z borůvkového džusu podávaného potkanům ve fyziologické dávce neovlivnily ani systémovou imunitu, ani se střevem asociovanou lymfoidní tkáň (GALT) a mezenterickou tukovou tkáň u zdravých bezproblémových potkanů. [21]

Podobně pochybuje o účinnosti antokyanů a fenolických kyselin v léčbě zánětu a metabolických odchylek i jiná studie. Ta se zabývala efektem uvedených sloučenin z fialové mrkve na tělesnou hmotnost, biochemické parametry, krevní tlak, lipidy, markery zánětu, funkci jater a apetit u 16 obézních účastníků mužského pohlaví. [22] Nebyl získán žádný důkaz, že by příjem 118,5 mg antokyanů na den a 259,2 mg fenolických kyselin na den po dobu 4 týdnů vedl ke statisticky významným změnám uvedených parametrů u těchto obézních jedinců při podané dávce a sledovaném čase. U intervenované skupiny byl nižší HDL cholesterol ($p < 0,05$). Aspartátaminotransferáza a alaninaminotransferáza nebyly změněny, což ukazuje, že intervence byla bezpečná. Z výsledků ale vyplývá, že je potřeba více studií ke stanovení biodostupnosti a farmakokinetiky antokyanů a fenolických kyselin z fialové mrkve před dalšími výzkumy účinnosti zaměřenými na léčbu zánětu a metabolických odchylek. [22]

6.4.2. Kardiovaskulární systém

V randomizované studii provedené na lidech byl zjišťován vliv každodenní konzumace borůvek (250 g po dobu 6 týdnů). [23] Ve srovnání s placebem nebyl u testovaných jedinců prokázán vliv na tělesnou hmotnost, ani celkový krevní tlak. Celkově se snížil augmentační index (snížení tuhosti artérií) a aortální systolický tlak, redoxní kapacita plazmy ovlivněna nebyla a zvýšil se absolutní počet NK buněk (natural killers, přirození zabíječi, složka nespecifické imunity). U jedinců, kteří měli na začátku studie tlak odpovídající prehypertenzi ($\geq 120/80$ mm Hg), bylo po 6 týdnech konzumace borůvek prokázáno významné snížení diastolického tlaku. [23]

V důsledku snížené dostupnosti a funkce endoteliálních progenitorových buněk je u onemocnění diabetes mellitus akcelerován proces aterosklerózy. [24] Byla provedena studie zabývající se protektivním účinkem antokyanu cyanidin-3-O-beta-glukosidu na funkci těchto buněk a na reparaci endotelu u diabetických myší s deficitem apolipoproteinu E. Zjistilo se, že cyanidin-3-glukosid zlepšuje sníženou funkci endoteliálních progenitorových buněk, zlepšuje reparaci endotelu, a tím omezuje akceleraci aterosklerózy způsobené diabetem. Uvedený antokyanin tedy může být potenciálně využit v prevenci a léčbě cévních komplikací diabetu. [24]

Byla zkoumána souvislost mezi obvyklým příjmem flavonoidů (mezi nimi také antokyanů – cyanidinu, delphinidinu, malvidinu, pelargonidinu, petunidinu a peonidinu)

a tuhostí artérií, středním krevním tlakem a aterosklerózou. [25] Vyšší příjem antokyanů byl spojen s výrazně nižším středním systolickým tlakem, středním arteriálním tlakem a nižší rychlostí pulzní vlny. [25] Vyšší příjem flavonů byl spojen s nižší rychlostí pulzní vlny. Konzumace 1-2 porcí plodů bohatých na antokyanany denně by tedy mohla být zařazena do stravy v rámci strategií zaměřených na snižování rizika kardiovaskulárních onemocnění u široké veřejnosti. [25]

Byl hodnocen ochranný vliv antokyanů (konkrétně cyanidin-3-glukosidu) před endoteliální dysfunkcí související s diabetem. Výsledky ukazují, že pro zlepšení funkcí endotelu u diabetu zprostředkované cyanidinem, je zapotřebí adiponektin - adipokin (protein tvořený tukovými buňkami) s ochranným vlivem na kardiovaskulární systém. [26] Léčba uvedeným antokyanem indukovala expresi a sekreci adiponektinu v kulturách 3T3 adipocytů prostřednictvím transkripčního faktoru Foxo 1. Tlumení exprese Foxo 1 zabránilo cyanidin-3-glukosidem indukované expresi adiponektinu. Naopak vyšší exprese Foxo 1 podpořila i expresi adiponektinu v adipocytech. Suplementace purifikovanými antokyanany dále výrazně zvýšila dilataci vyvolanou průtokem a zvýšila sérové koncentrace adiponektinu u pacientů s diabetem typu 2. Adiponektin aktivuje cAMP-PKA-eNOS signální cesty v lidských aortálních endoteliálních buňkách, což zvyšuje biodostupnost oxidu dusnatého. [26]

6.4.3. Kostní tkáň

Fenolické sloučeniny získané z ostružin a borůvek prokázaly ve studiích na zvířatech protektivní účinky na kostní tkáň. Předpokládalo se tedy, že konzumace těchto plodů (45 g denně po dobu 9 měsíců) bude působit preventivně u žen po menopauze proti úbytku kostní hmoty vyvolané kouřením. [27] Plody obsahovaly antokyanany (deriváty cyanidinu, delphinidinu, malvidinu, peonidinu a petunidinu), flavonoly (především deriváty kvercetinu) a ellagotaniny. Ve studii byla měřena minerální denzita kosti na počátku a po 9 měsících a dále deoxyypyridinolin v moči, alkalická fosfatáza v kosti, osteokalcin, reaktivní substance kyseliny thiobarbiturové a vysoce sensitivní C-reaktivní protein v 0, 3, 6, 9 měsících. Výsledky ukázaly, že před úbytkem kostní hmoty u žen kuřaček po menopauze, mírně chrání jen obsahové látky z ostružiny, nikoli z borůvky. [27]

6.4.4. Protiinfekční, protivirové a protibakteriální účinky

V pilotní studii byla hodnocena frekvence medicínsky léčených infekcí močového traktu u obyvatel domů s pečovatelskou službou, kde jsou tyto infekce velmi častým problémem. Během 6 měsíců zkřížené studie byla testovaným jedincům podávána šťáva z aronie (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot, Malaceae) nebo placebo. [28] Podávaná šťáva obsahovala vysoké procento fenolických sloučenin (prokyanidiny, antokyany a chlorogenovou kyselinu). Výsledky neukázaly žádné bezprostřední snížení frekvence infekcí močových cest nebo celkového užívání antibiotik. Během tříměsíční periody podávání šťávy bylo ale pozorováno snížení užívání antibiotik na infekce močového ústrojí. Nebyly pozorovány žádné změny ve výskytu jiných infekcí. [28]

Byl hodnocen protivirový účinek koncentrované šťávy z černého bezu na lidský virus chřipky. [29] Koncentrovaná šťáva měla příznivý účinek na stimulaci imunity a prevenci virové infekce. Šťáva vykazovala relativně silný účinek na myši infikované virem, přestože na buněčné kultury působila poměrně slabě. Perorální podávání vysokomolekulární frakce koncentrované šťávy potlačilo u myši replikaci viru v bronchoalveolární tekutině. V séru zvýšilo hladinu neutralizační protilátky a v bronchoalveolární tekutině a výkalech hladinu sekrečního IgA. [29]

Byl testován efekt šťávy z plodů černého rybízu na proliferaci bakterií rodu *Salmonella* a *Lactobacillus* a na jejich schopnost adheze na model buněk střevních epitelii. [30] Šťáva z plodů obsahovala velké množství antokyanů, které přispívaly k vysoké antioxidační kapacitě šťávy. Podle výsledků šťáva inhibovala proliferaci bakterie *Salmonella enterica*, serovaru *Typhimurium*, a *in vitro* také její adhezi ke střevním epitelialním buňkám. Proliferaci *Lactobacillus rhamnosus* naopak zvyšovala. Testovaná šťáva obsahovala vysoké množství cyanidin-rutinosidu. [30]

Plody pocházející z planých odrůd jsou hodnotným zdrojem látek s protivirovým působením. *In vitro* byl zkoumán účinek plodů z planých rostlin: jahod (*Fragaria vesca* L.), malin (*Rubus idaeus* L.), borůvky (*Vaccinium myrtillus* L.) a brusinky (*Vaccinium vitis-idaea* L.) proti virům. [31] Z čeledi *Picornaviridae* byl testován účinek na poliovirus typu 1 a coxsackie virus B1, z čeledi *Paramyxoviridae* na syncytiální virus A2 a z čeledi *Orthomyxoviridae* na virus chřipky A/H3N2. Výsledky odhalily, že sumární metanolové extrakty připravené ze všech testovaných plodů inhibují replikaci

coxsackie viru B1 a chřipkového viru A. Replikaci viru chřipky silně inhibovaly také antokyaninové frakce připravené ze všech plodů. [31]

Byla zkoumána také antimikrobiální aktivita šťávy z ostružiny (*Rubus fruticosus*) proti alimentárním patogenům zahrnující *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* a *Escherichia coli*. [32] Dále byl zkoumán účinek šťávy z ostružiny na růst *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* a *Lactobacillus rhamnosus* v mléku a nutričně bohatém médiu obohaceném o tuto šťávu. Růst uvedených patogenních bakterií byl šťávou významně inhibován v mléku i médiu, naopak růst kmenů *Lactobacillus* byl výrazně stimulován. Tyto výsledky ukazují, že zředěná šťáva z ostružiny může být použita jako konzervační prostředek při zpracování potravin a působit jako přírodní antimikrobiální látka proti původcům alimentárních infekcí. [32]

6.4.5. Antioxidační účinky

Byly hodnoceny příznivé účinky dlouhodobé konzumace přírodní šťávy z plodů aronie, *Aronia melanocarpa*, bohaté na polyfenoly (včetně antokyanů) u zdravých dobrovolníků. [33] Po 12 týdnech pravidelné konzumace šťávy byl pozorován pozitivní vliv na korelaci mezi věkem, body mass indexem, obvodem pasu, procentem tělesného tuku, krevním tlakem a analyzovanými markery peroxidace lipidů. Výsledky ukázaly mírnou modulaci některých biomarkerů antioxidačního/pro-oxidačního stavu u zdravých jedinců, což by mohlo znamenat profylaktické působení šťávy z aronie bohaté na polyfenoly a podporovat tak její význam jako součást optimální diety. [33]

Při porovnávání plodů 4 kultivarů aronie (pocházejících z *Aronia melanocarpa* a *Aronia prunifolia*) byl hlavním antokyanem u všech kultivarů zjištěn cyanidin-3-galaktosid. Plody vykazovaly antioxidační účinky a působily jako inhibitory enzymů (15-lipoxygenázy, xantinoxidázy a α -glukosidázy), rozdíly mezi kultivary byly jen minimální. Nejbohatším zdrojem polyfenolů byly plody pocházející z *Aronia prunifolia*. [34]

Antioxidační působení *Aronia melanocarpa* bylo studováno *in vivo* na zdravých potkanech. [35] Ti byli po dobu 6 týdnů krmeni normální dietou obohacenou o šťávu z plodů. Výsledná data ukázala, že příjem šťávy z plodů koreloval s poklesem markerů oxidačního stresu jako například antioxidační aktivitou, celkovým množstvím

thiolových skupin a glutathionu. Léčba neovlivnila běžné biochemické parametry, ani enzymy katalázu a cerulopasmin. [35]

In vitro byl zjišťován efekt plodů brusinek a planých borůvek na střevní buňky, především na mírnění oxidačního stresu a s ním spojených reaktivních kyslíkových radikálů (ROS). [36] Podle výsledků se zdá, že brusinky neztrácí antioxidační aktivitu, pokud projdou zažívacím ústrojím a zkonsumované brusinky mohou přispívat ke zvýšení cytoprotektivního efektu ve střevních buňkách tím, že redukuje jejich potenciální poškození způsobené volnými radikály a kyslíkovými radikály odvozenými z jiných zdrojů potravy. [36]

V plodech *Sambucus nigra* a *Sambucus ebulus* byla zkoumána jejich antioxidační kapacita a zastoupení oxidačně působících látek. [37] Primárními zdroji antioxidační kapacity byly v obou hodnocených extraktech fenolické kyseliny a flavonoidy (flavonoly a antokyany). Nejhojnějším antokyanem byl cyanidin-3-O-sambubiosid, který představoval více než polovinu všech antokyanů identifikovaných v plodech. Hlavním flavonoidem extraktů byl rutin, vyšší množství bylo v *Sambucus nigra*. Vyšší antioxidační aktivitu prokázaly plody *Sambucus ebulus*, které byly bohatší na antokyany. [37]

Byl sledován osud antioxidantů v průběhu zpracovávání plodů. [38] Antokyany přispívaly k více než 50% z celkové antioxidační kapacity vzorků. Ke zjištění přítomnosti antioxidantů v séru byl poté použit *in vitro* systém simulující gastrointestinální trávení. Ukázalo se, že dostupnost antokyanů byla mnohem vyšší u zpracovaného nektaru než u čerstvého ovoce. [38]

6.4.6. Neuroprotektivní efekt

Na kulturách buněk představujících model Parkinsonovy choroby se zkoumalo, zda extrakty bohaté na antokyany, proantokyanidiny nebo jiné polyfenoly potlačují neurotoxické působení rotenonu. [39] Extrakty připravené z borůvek, semen hroznového vína, květů ibišku, plodů černého rybízu a čínské moruše, potlačily zánik dopaminergních buněk vyvolaný rotenonem. Extrakty bohaté na antokyany a proantokyanidiny vykazovaly vyšší neuroprotektivní aktivitu než extrakty bohaté na jiné polyfenoly a řada jednotlivých antokyanů s neurotoxicitou rotenonu interferovala. Extrakty z borůvek a semen hroznového vína zvrátily rotenonem indukované poškození

mitochondriální respirace a základní extrakt zmírnil lipopolysacharidy stimulované uvolnění nitritu z buněk mikroglíí. Výsledky tedy naznačují, že extrakty bohaté na antokyany a proantokyanidiny, mohou díky posílení funkce mitochondrií zmírnit neurodegenerativní změny, ke kterým dochází u Parkinsonovy nemoci. [39]

6.4.7. Diabetes mellitus, obezita a metabolický syndrom

Významný pokles glykémie byl pozorován u diabetických potkanů léčených šťávou z plodů *Aronia melanocarpa*, která je bohatým zdrojem antokyanů. [35]

Byl testován soubor extraktů z planých plodů a zjišťován inhibiční efekt na akumulaci glykačních produktů, schopnost extraktu vychytávat radikály a celkový obsah polyfenolů a antokyanů. [40] Všechny vzorky redukovaly formaci konečných produktů glykace v závislosti na koncentraci, která u jednotlivých extraktů pozitivně korelovala s celkovým obsahem fenolů a v menší míře s celkovým obsahem antokyanů. Inhibice formace glykačních produktů souvisela se schopností vychytávat radikály. Studie ukázala, že kromě již dříve popsanych účinků obsahových látek plodů a jejich fenolických metabolitů, vykazují plody a v nich obsažené látky také antiglykační aktivitu. Tato schopnost by mohla být využita v prevenci a terapii chronických onemocnění spojených s akumulací konečných produktů glykace a jejich toxicitou. [40]

Významným zdrojem antokyanů a jiných fenolů jsou například plody borůvky, ostružiny nebo moruše. Extrakty z nich byly testovány na potkanech s diabetem jako prostředky působící proti hyperglykémii. [41] Extrakty byly potkanům podávány v pitné vodě po dobu 5 týdnů. Léčba extraktem z borůvky nepřinesla žádné uspokojivé výsledky. Podávání extraktu z ostružiny vedlo k významnému poklesu hladiny glukózy ze 360 na přibližně 270 mg/100 ml ($p < 0,05$), stejně jako podávání extraktu z moruše, které snížilo hladinu glukózy ze 252 mg/100 ml na 155 mg/100 ml ($p < 0,05$). [41]

Obezita je spojená s mnoha dalšími onemocněními, jako jsou například kardiovaskulární onemocnění nebo diabetes mellitus typu 2. Efekt podávání šťávy bohaté na antokyany na některé rizikové faktory těchto chorob byl zkoumán na potkanech po dobu 10 týdnů. [42] Konzumace šťávy z plodů borůvky *Vaccinium myrtillus* snížila hladinu cholesterolu v séru a měla tendenci snížit také triglyceridy. Žádný efekt ale nebyl pozorován u sérových neesterifikovaných mastných kyselin, glukózy a insulinu. Podávání šťávy dále vedlo ke snížení hladin leptinu a resistinu v séru, neprokázalo ale žádný vliv na sérový adiponektin a sekreci adipokinů

z mesenterické tukové tkáně. Šťáva bohatá na antokyany zvýšila v plazmě poměr polynenasycených mastných kyselin a snížila množství nasycených mastných kyselin. Z uvedených výsledků vyplývá, že antokyany mají potenciál působit preventivně před onemocněními souvisejícími s diabetem. [42]

Zjistilo se také, že antokyany a flavonoidy, především luteolin, apigenin, flavon, a stilbenoid resveratrol, mohou působit jako přirozeně se vyskytující inhibitory dipeptidyl peptidázy IV, tedy aminopeptidázy, která má regulační efekt na inkretinové hormony. [43]

Extrakty z některých plodů bohaté na polyfenoly inhibovaly *in vitro* aktivitu α -glukosidázy. [44] Mezi dva nejúčinnější extrakty patřily ty z černého rybízu a jeřabiny *Sorbus acuparia* L., které inhibovaly α -glukosidázu stejně účinně jako inhibitor akarbóza. Uvedené extrakty se výrazně lišily ve složení polyfenolů. U černého rybízu dominovaly antokyany (70 % celkových polyfenolů), zatímco u jeřabiny se vyskytovala především kyselina chlorogenová (65% celkových), antokyanů bylo méně. Oba extrakty potencovaly inhibiční efekt akarbózy a mohly by tak umožnit snížit podávanou dávku. Nebyly zaznamenány žádné aditivní účinky, pokud byly extrakty z černého rybízu a jeřabiny přidány v kombinaci. Uvedené polyfenoly by mohly být využity u diabetu typu 2 ke kontrole glykémie. [44]

Na lidských střevních Caco-2 buňkách byl hodnocen efekt extraktu z plodů bohatého na antokyany na uptake glukózy těmito buňkami. [45] Akutní expozice (15 min) extraktu (0,125 % m/v) výrazně snížila jak na sodíku závislý (celkový), tak na sodíku nezávislý (usnadněný) příjem glukózy. V déle trvajících studiích byla významně snížena exprese SGLT1 mRNA a GLUT2 mRNA. Tato *in vitro* získaná data podporují již dřívější zjištění, že polyfenoly interagují přímo s glukózovými transportéry a regulují tak míru absorpce glukózy. Výsledky dále naznačují, že flavonoidy mohou modulovat postprandiální glykémii snížením exprese glukózových transportérů. [45]

Osemení z černých sójových bobů obsahuje vysoké hladiny polyfenolů jako jsou antokyany (cyanidin-3-glukosid) a procyanidiny. Zjistilo se, že podávání extraktu z osemení, zmírňuje u myši s diabetem typu 2 hyperglykémii a zlepšuje senzitivitu k inzulínu a to prostřednictvím aktivace AMP-aktivované proteinkinázy (AMPK). [46] AMPK byla aktivována v kosterní svalovině a v játrech. Aktivace byla v kosterním svalu doprovázena up-regulací glukózového transportéru 4 a v játrech down-regulací glukoneogeneze. *In vitro* studie využívající L6 myotubuly ukázala, že cyanidin-3-

glukosid a procyanidiny výrazně indukovaly aktivaci AMPK a zvýšily uptake glukózy do buněk. [46]

6.4.8. Zrak

Postižení zraku a vaskulární dysfunkce související s obezitou a diabetem jsou narůstající příčinou ztráty zraku. [47] Detailní mechanismy, kterými obezita a diabetes ovlivňují zdraví oka, jsou zatím spíše neznámé, na zvířecích modelech jsou ale zkoumány účinky potenciálně protektivních sloučenin, například sloučenin s antioxidačními a protizánětlivými vlastnostmi. Těmito vlastnostmi disponují antokyany, jejichž zdrojem jsou borůvky (evropské plané borůvky, *Vaccinium myrtillus*). Byla provedena studie, zabývající se protektivním efektem borůvek v potravě na hladinu genové exprese v retinách myší, u kterých byla navozena obezita krměním vysoce tučnou stravou. [47] Krmění tučnou stravou vyvolalo u myší v retině odlišnou expresi několika stresových genů. I přes menší vlivy fenotypu zmírnila dieta bohatá na borůvky upregulaci krystalinů indukovaných tučnou potravou. Časným stádiím změn genové exprese v retině spojených s obezitou by mohlo být předcházeno stravou bohatou na borůvky. [47]

6.4.9. Chemoprotektivní působení

Již v dřívějších studiích bylo prokázáno, že strava doplněná o borůvky, představuje ochranu před tumorogenezí mléčné žlázy zprostředkovanou 17 β -estradiolem. Na zvířatech byl proto zkoumán preventivní i terapeutický efekt stravy doplněné o prášek z borůvek. [48] Zvířata dostávala 5% borůvkovou potravu buď 2 týdny před (preventivní skupina) nebo 12 týdnů po léčbě nádoru (terapeutická skupina). Obě intervence zpozdily dobu latence pro hmatatelný nádor o 28, respektive 37 dnů. Velikost nádoru a mnohočetnost byly také v obou případech významně redukovány. Efekt na tumorogenezi prsní žlázy byl způsoben především down-regulací CYP 1A1, expresí genu ER- α a také příznivou modulací hladin mikro-RNA. [48]

Byl zkoumán chemoprotektivní potenciál flavonoidů a potraviny bohaté na tyto sloučeniny na orální kancerogenezi u lidí. [49] Mezi slibná chemoprotektiva patřily u

tohoto typu rakoviny především antokyany a dále epigallokatechin gallát, tedy sloučeniny vyskytující se hojně například v zeleném čaji a ostružinách. [49]

6.5. Alergie na černý bez

Pacienti trpící v průběhu letních měsíců alergickou rinokonjunktivitidou a obtížemi s dýcháním mohou mít stejné symptomy také po kontaktu s květy nebo dietními produkty z černého bezu *Sambucus nigra*. Extrakty z bezového pylu, květů a plodů byly zkoumány za účelem zjištění alergenů odpovědných za tyto symptomy a zjišťována byla také zkřížená reaktivita s alergeny z břízy, trávy a pelyňku. [50] Z 3668 pacientů studovaných v rámci randomizované studie vykázalo 0,6% pozitivní reakci k bezu (kožní prick test a/nebo RAST - radioalergosorbent test). IgE v séru pacientů odhalila v extraktech z bezového pylu, květů a plodů převládající alergen o 33,2 kDa, s izoelektrickým bodem v pH 7,0. Při studování zkřížené reaktivity se ukázalo, že se nejspíše jedná o nový alergen, Sam n1, který nevykazuje homologii s žádnými dosud definovanými alergeny, ale s ribozomy inaktivujícími proteiny, objevenými již dříve v rostlině *Sambucus ebulus* a dřevu a plodech *Sambucus nigra*. [50]

Hlavním proteinem plodů černého bezu je lektin, nazvaný aglutinin IV f nebo SNAIVf. [51] Zjistilo se, že tento lektin je kódován zkráceným genem pro ribozom inaktivující proteiny typu 2. Tyto výsledky přináší důležité informace týkající se molekulární evoluce ribozom inaktivujících proteinů a lektinů [51]

Jiný lektin, *Sambucus nigra* aglutinin, je schopen indukovat uvolnění IL-4 z lidských bazofilů a stimulovat také uvolnění IL-13 a histaminu. [52] Uvolněné interleukiny IL-4 a IL-13 dosahují maxima po 4-6 hodinách, respektive více než 18 hodinách. Zjistilo se, že se lektiny váží na IgE, a že toto navázání je zřejmě prvním signálním krokem. Vzhledem k tomu, že lektiny jsou po perorálním podání schopné vstoupit do krevního oběhu, mohou hrát roli ve vyvolání takzvané časné IL-4 potřebné ke změně imunitní reakce směrem k Th2 odpovědi a alergii typu I. [52]

Toxické a alergenní lektiny se bohužel jeví jako důležité pro antivirovou aktivitu bezu, což bylo zjištěno například ve studiích s transgenním tabákem. [53,54] Potenciálně vykazují také antiproliferativní účinky. [55]

Alergie na produkty z černého bezu je pravděpodobně možná, zatím ale není v literatuře blíže popsána.

6.6. Vliv způsobu zpracování plodů s obsahem antokyanů na biologické účinky

6.6.1. Volba podmínek extrakce

Volba rozpouštědla použitého pro extrakci ovlivňuje její účinnost. [56] Potvrzeno to bylo také při hodnocení obsahu celkových fenolů, antokyanů a antioxidační kapacity v plodech černé moruše (*Morus nigra*), ostružiny (*Rubus ulmigiolius*) a jahody (*Fragaria x ananassa*). U všech analyzovaných plodů se jako nejvýhodnější extrakční směs pro fenolické sloučeniny ukázala směs aceton/voda (70/30, v/v), nejvyšší obsah antokyanů byl získán extrakcí směsí metanol/voda/octová kyselina (70/29,5/0,5, v/v/v). U testování antioxidační kapacity extraktů se účinnost extrakčních směsí u jednotlivých plodů lišila. U černé moruše to byl etanol/voda (50/50, v/v), u ostružin aceton/voda/octová kyselina (70/29,5/0,5, v/v/v) a u jahod aceton/voda (50/50, v/v). [56]

Volbou rozpouštědla a dobou extrahování může být ovlivněna také stabilita extraktů z plodů. [57] Při extrahování obsahových látek (antokyanů, fenolů a flavonoidů) z višně byl nejúčinnějším rozpouštědlem metanol okyselený kyselinou chlorovodíkovou. Nejvyšší obsah zkoumaných sloučenin byl pozorován po jedné hodině extrakce, s výjimkou fenolů, u kterých prodloužení doby extrahování vedlo ke zvýšení výtěžnosti. V průběhu skladování vzorků se snížil obsah antokyanů, celkových fenolů, flavonoidů a klesla antioxidační kapacita, naopak procento polymerních barev se zvýšilo. [57]

Pro zvýšení účinnosti konvenčních metod extrakce byl vyvinut nový sekvenční extrakční postup. [58] Ten se skládá ze 3 odlišných kroků v převládajícím nízkém pH. Sekvenční extrakční postup v kaskádovém uspořádání zahrnoval aplikaci 70% etanolu s 0,01% HCl, 70% metanolu s 0,01% HCl a 70% acetonu s 0,01% HCl v odlišném složení (samotné rozpouštědlo ve 3 po sobě jdoucích krocích, nebo 2 odlišná rozpouštědla v rozdílných sekvencích, nebo sekvenční tříkroková kaskádová extrakce v různém pořadí specifických rozpouštědel). Při srovnání účinnosti s běžnými metodami

byly pozorovány významně vyšší výtěžky antokyanů, pokud byla použita tříkroková extrakce. [58]

6.6.2. Zpracování plodů

Plody *Sambucus ebulus* obsahují kromě antokyanů také lektiny (ebulin f a SELfd), které vykazují homologii sekvence aminokyselin s alergenem Sam n1 z pylu a plodů *Sambucus nigra*. Lektiny jsou po perorální konzumaci toxické. Zjišťovalo se proto, zda je nějakým způsobem možné eliminovat toxicitu těchto lektinů a zároveň zachovat antioxidační vlastnosti plodů *Sambucus ebulus*. [59] Zjištěno bylo, že zahřátí 5 minut na vroucí vodní lázni, plně senzitivizovalo oba obsažené lektiny k působení pepsinu v zažívacím ústrojí a zároveň minimálně snižovalo aktivitu fenolů, antioxidantů a schopnost vychytávat volné radikály. Zdá se tedy, že je možné eliminovat potenciální rizika pramenící z přítomnosti lektinů ve šťávě bez současného významného snížení obsahu antioxidačně působících sloučenin. [59]

Na obsah účinných látek má vliv také zmrazení plodů. [60] V průběhu skladování ostružin ve zmrazené podobě došlo ke ztrátě vitamínu C na 80% a dále ke změnám barvy do odstínů modré a žluté. Změny barvy byly spojeny se zvýšením pH a změnou antokyanů. Většina fenolických sloučenin, cukrů a organických kyselin byla ale po skladování snadněji extrahována a to především při pomalém zmrazování, při kterém došlo vyššímu stupni poškození pletiva. [60]

Koncentrace antokyanů, proantokyanidinů a chlorogenové kyseliny u plodů planých borůvek může být ovlivněna běžnými kuchyňskými úpravami jako je pečení, vaření a ohřívání v mikrovlnné troubě. [61] Množství antokyanů, proantokyanidinů a chlorogenové kyseliny u rychle zmrazených plodů vystaveným změnám teplot (které jsou při distribuci a manipulaci v maloobchodech běžné) kleslo o přibližně 8, 43 a 60% ve srovnání se zmrazenými plody, které ale byly skladovány při stále stejné teplotě - 80°C již od sklizně. Pečení zmrazených plodů snížilo obsah antokyanů, proantokyanidinů a chlorogenové kyseliny o 11,2; 14,6; respektive 10,6%. Vaření snížilo obsah antokyanů, proantokyanidinů a chlorogenové kyseliny o 7,4; 14,4; respektive 36,8%. U plodů vystavených mikrovlnám po dobu 1 minuty se zvýšil obsah antokyanů o 12,9%, ale vystavení mikrovlnám po dobu 3 a 5 minut vyústilo ve významný pokles těchto sloučenin (29,8% a 81,6%). Koncentrace proantokyanidinů u

plodů vystavených mikrovlnám po dobu 1, 3 a 5 minut se snížily o 14,3; 5,4; respektive 87,1%; koncentrace kyseliny chlorogenové nebyly významněji ovlivněny. [61]

Při koncentraci 25 µg/ml si pečené a vařené extrakty z borůvek zachovaly schopnost inhibovat reaktivní kyslíkové radikály indukované lipopolysacharidy v buňkách SH-SY5Y (model zánětu). Extrakty vystavené mikrovlnám po dobu 1 nebo 3 minut si v tomto modelu udržely bioaktivitu, zatímco extrakty vystavené mikrovlnám 5 minut už nebyly schopny inhibovat indukované kyslíkové radikály. [61]

Stabilita antokyanů ve šťávě z plodů je ovlivněna skladovací teplotou. [62] Záleží přitom na mnoha faktorech jako je typ antokyaninu, původ šťávy a především skladovací teplota. Ve studii se zjistilo, že poločas antokyanů je mnohem kratší při pokojové teplotě než v chladu. Více stabilní byly antokyaniny ve šťávě z aronie než ve šťávě z černého rybízu nebo šťávě z plodů šichy, *Empetrum* L. (Empetraceae). Jejich poločas byl při teplotě 21°C 6,7 týdnů; při teplotě 9°C 23,8 týdnů a při 4°C 32,5 týdnů. Antokyanům dále uškodila dlouhá doba použitelnosti běžná u komerčních džusů. Při skladování po dobu 35-49 týdnů při pokojové teplotě bylo ve šťávě detekováno pouze 11-15% původního obsahu antokyanů. [62]

Koncentrace fenolů klesla u pasterizovaných džusů z borůvky, černého bezu a černého rybízu při skladování asi o 40% během prvních třiceti dnů. [63]

Výlisek z plodů černého bezu, vedlejší produkt při zpracování šťávy, je stále bohatým zdrojem aktivních sloučenin, především antioxidantů a fenolických sloučenin. [64] Jednoduchou extrakcí rozpouštědlem může být z výlisku připraveno potravinářské barvivo. Poměr rozpouštědel 1:20 s 50% etanolem se ukázal jako optimální k získání extraktu bohatého na antioxidanty s inhibičním efektem proti *Lysteria monocytogenes* a *Enterococcus faecalis*. V extraktu byly pomocí HPLC identifikovány 3 hlavní fenolické sloučeniny: kyselina chlorogenová, rutin a kumarová kyselina. Na základě výsledků se výlisek z plodů bezu může využít jako surovina k vývoji přírodních potravinových přísad. [64]

Ve víně z černého bezu bylo detekováno 3,65-12,36 mg histaminu na litr vína. [65] Obsah histaminu závisel na úpravě plodů před zpracováním a na volbě kvasinkového kmene pro fermentaci. Bylo zjištěno, že histamin se tvoří v důsledku působení histidin dekarboxylázy obsažené v plodech, dále působením enzymů obsažených v přípravku „Pectopol PT“ (polský pektolytický přípravek), a v průběhu fermentace působením histidin dekarboxylázy produkované kvasinkami. [65]

Na kvalitu extraktů může mít vliv také teplota při zpracování. Byla zkoumána termální degradace acylovaných a neacylovaných antokyanů. [66] Antokyaniny izolované z koncentrátů z jahody, bezu a černé mrkve byly po dobu 7 hodin vystaveny teplotě 95°C v pH 1. Antokyaninové glykosidy byly štěpeny postupnou ztrátou sacharidových skupin, přičemž pentózy byly odděleny snadněji než hexózy. Aglykony byly dále degradovány rozštěpením na floroglucinaldehyd (cyanidin, pelargonidin), 4-hydroxybenzoovou kyselinu (pelargonidin) a protokatechovou kyselinu (cyanidin). Acylované triglykosidy cyanidinu z černé mrkve byly degradovány na odpovídající diglykosidy, které nejsou původními pigmenty mrkve. Navíc se vytvořily glykosidy hydroxyskořicové kyseliny. Předpokládá se proto, že sledování termální zátížení v průběhu zpracování potravy obsahující antokyaniny může být monitorováno profilem barevných a bezbarvých sloučenin. [66]

Strukturální změny antokyanů z purifikovaných frakcí z jahody, černého bezu a černé mrkve byly dále zkoumány v podmínkách pH 3,5 při zahřívání na 95°C po dobu 6 hodin. [67] Zjistilo se, že degradační cesty se při uvedeném pH 3,5 odlišují od degradačních cest v pH 1. Kromě jiného byly při 320 nm v zahříváních izolátů pigmentů jahody a bezu detekovány glykosidy chalkonů, a degradaci antokyanů zahájilo otevření pyryliového kruhu. V případě acylovaných antokyanů byly z flavyliové struktury jako první odděleny acyl-glykosidové skupiny. Konečnými produkty degradace byly u všech pigmentových izolátů fenolické kyseliny a floroglucinaldehyd jako pozůstatky kruhů B a A. Po zahřívání bylo u všech vzorků pozorováno snížení antioxidační kapacity, které bylo přičítáno jak antokyanům, tak bezbarvým degradačním produktům. Podle poměru hodnoty antioxidační kapacity a obsahu antokyanů bylo odvozeno, že ztráta bioaktivity antokyanů nemůže být kompenzována antioxidační kapacitou nově vytvořených bezbarvých fenolů. [67]

6.7. Metabolismus u člověka

Účinky antokyanů na lidské zdraví už byly prokázány v mnoha studiích. To, co však dosud zůstává relativně neznámé, je absorpce, distribuce, metabolismus a exkrece antokyanů z potravy bohaté na tyto sloučeniny. [68] Předmětem zájmu odborníků jsou v současné době nejen jejich biologické účinky, ale také farmakokinetické vlastnosti a profil u člověka.

Výsledky nových studií naznačují, že působení antokyanů je podstatně významnější než se dříve předpokládalo. [69]

Absorpce, distribuce a metabolismus antokyanů u člověka byly zkoumány pomocí konzumace značeného cyanidin-3-glukosidu. [68] V této studii zkonzumovalo v jedné bolusové dávce 8 účastníků mužského pohlaví (zdraví jedinci, co nejvíce homogenní populace, minimálně metabolicky odlišní) 500 mg značeného cyanidin-3-glukosidu ($^{13}\text{C}_5$ - 5 značených izotopů uhlíku v podané sloučenině). Ukázalo se, že antokyany jsou dostupné více než se dříve předpokládalo, a jejich metabolity jsou přítomné v oběhu dříve než 48 hodin po požití. Průměrné procento $^{13}\text{C}_5$ získané z moči, dechu a stolice se pohybovalo kolem $43,9\% \pm 25,9\%$. Relativní biodostupnost cyanidin-3-glukosidu byla $12,38 \pm 1,38\%$. Maximální míra eliminace značeného izotopu uhlíku byla dosažena 30 minut po požití, zatímco značené metabolity dosáhly maxima v séru po $10,25 \pm 4,14$ hodinách. Poločas značených metabolitů se pohyboval od $12,44 \pm 4,22$ hodin pro degradační produkty (kyselina protokatechová a floroglucinaldehyd) k $51,62 \pm 22,55$ hodin (ferulová kyselina). Eliminace značeného izotopu byla mezi 0 a 1. hodinou nejvyšší močí, v 6. hodině dechem a mezi 6. a 24. hodinou stolicí. Nejvyšší koncentrace značených metabolitů byla nalezena v moči a vzorcích stolice mezi 6. a 24. hodinou. [68]

Lidské jaterní mikrozomy metabolizují cyanidin na protokatechovou kyselinu, která je dále metabolizována na 3 konjugáty typu glukuronidů. [70] Podobně je metabolizován pelargonidin na 4-hydroxybenzoovou kyselinu, která je dále metabolizována na dva další konjugáty typu glukuronidů.

Jiná studie se zabývala detekcí antokyanů a antokyanidinů ve zvířecích tkáních, konkrétně v plicích. [71] Experiment byl proveden na myších krmených potravou

s obsahem borůvek (5% m/m) po dobu 10 dnů nebo bolusovou dávkou (10 mg/myš) směsi z borůvek. Všechny 5 antokyanů přítomných v borůvkách bylo v plicní tkáni detekováno, což dokazuje jejich dostupnost z gastrointestinálního traktu. [71]

6.7.1. Farmakokinetický profil u člověka

Antokyaniny jsou po zkonsumování okamžitě detekovány v plazmě v jejich nezměněné formě a jsou tudíž vstřebávány přes žaludeční stěnu do krevního oběhu. [72,73,74,75] V žaludku se vyskytují pouze jako nativní formy, zatímco v jiných orgánech (jejunum, játra, ledviny) jsou kromě nativních přítomny i formy metylované a dále konjugáty antokyanidinů. [76] Mohou se akumulovat v různých tkáních, včetně tkání za hematoencefalickou bariérou. [77] Metabolity antokyanů byly ve studii na potkaních identifikovány například v močovém měchýři, prostatě, varlatech, srdci nebo tukové tkáni. [78]

Absorpce v ústní dutině

Studie na zdravých dobrovolnících ukázala, že antokyaniny z ostružin mohou být detekovány jako jejich hydrolyzované aglykony v ústní dutině. Je to výsledek aktivity β -glykosidázy z bakterií a orálních epitelálních buněk. [79] Ve slinách byly detekovány i původní antokyaniny a protokatechová kyselina (metabolit cyanidin-3-glukosidu) a dále glukuronidy antokyanů. [79]

Absorpce v žaludku

Podle výsledků různých studií se zdá, že antokyaniny jsou v žaludku absorbovány ve formě glykosidů a nikoli v podobě metabolitů. [80,81,82,83,84] Do systémové cirkulace vstupují v nativní formě nebo metabolizované a biologickou aktivitu vykazují již 30 min po požití. Mechanismus absorpce ale není zatím znám. Zdá se, že glukózové transportéry nejsou v absorpci ze žaludku využívány. [85]

Cyanidin-3-glukosid je pravděpodobně schopen procházet v intaktní podobě gastrointestinální stěnou, podobně jako jiné antokyaniny podléhat následně first pass metabolismu a do oběhu vstupovat v podobě metabolitů. [76,86,87,88,89,90]

V gastrointestinální stěně antokyany zřejmě dosahují farmakologicky účinné koncentrace a lokálně zde uplatňují svůj protektivní účinek. [79,91,92]

Předpokládá se, že se v žaludku antokyany váží na dosud neidentifikovaný protein a proto nemohou být pomocí HPLC kvantifikovány jako volné. [87]

V žaludku je přítomen aniontový přenašeč bilitranslokáza. [93,94] Její normální transportní aktivita je *in vitro* kompetitivně inhibována chinoidními formami antokyanů z potravy, což naznačuje, že možná podporuje facilitovanou difúzi antokyanů. [95] Zjištěno to ale bylo ve studii *in vitro* v pH 8,0, což je vzdálené podmínkám v žaludku a žádné chinoidní formy by nemohly být detekovány. Bilitranslokáza by spíše mohla být zahrnuta v absorpci chinoidních forem antokyanů v játrech.

Mezi další možné transportéry v žaludku by mohly patřit GLUT1, OAT2, SMCT1 a SMCT2. [96,97,98]

Intestinální absorpce

Antokyany, které nebyly absorbovány ze žaludku, se dostávají do tenkého střeva. Zdejší bazické prostředí vede k převaze pseudobáze. Na rozdíl od flavonoidů, u kterých jsou glykosidy hydrolyzovány, glykosidy antokyanů jsou rychle a efektivně v tenkém střevě absorbovány. [99,100,101] Jsou také rychle metabolizovány a objevují se v oběhu nebo jsou exkretovány do žluči a moči v intaktní i metabolizované formě (glukuronidy, sulfáty, metylované deriváty). [81,99,100,102,103,104,105]

Potenciální mechanismus absorpce glykosidů může nejspíš zahrnovat specifický glukózový transportér (například SGLT1), jak už se předpokládalo dříve u flavonoidů [106] Roli hraje možná i GLUT2. [88] Jiný pravděpodobný mechanismus může zahrnovat hydrolyzu antokyanů pomocí enzymů kartáčového lemu a to přednostně před pasivní difúzí aglykonů, která už byla dokázána u flavonoidů. [106,107]

Neabsorbované antokyany se dostávají do kolonu, kde podléhají strukturálním modifikacím. Podle dřívějších studií se toto děje buď spontánní degradací ve fyziologických podmínkách, nebo za přispění mikrobiálního metabolismu. [108] Bakteriální mikroflóra kolonu ve skutečnosti hydrolyzuje glykosidy na jednotlivé aglykony a degraduje je dále na jednoduché fenolické kyseliny.

Protože fenolické kyseliny mohou být dále absorbovány v kolonu [109], je pravděpodobné, že jsou kromě toho metabolizovány jaterními buňkami. [110] Příznivé

účinky na zdraví, které vykazují potraviny bohaté na antokyany, mohou být vysvětleny pomalým a kontinuálním uvolňováním fenolických sloučenin přes střeva do krevního oběhu.

6.7.2. Role střevní mikroflóry v biodostupnosti a biologické aktivitě antokyanů

Metabolismus antokyanů zahrnuje metylaci, sulfataci a konjugaci s kyselinou glukuronovou, ale i degradaci glykosidových vazeb a štěpení heterocyklu. [111,112,113] Pro tyto reakce jsou nezbytné enzymy jako β -D-glykosidázy, β -D-glukuronidázy a α -L-rhamnosidázy, které uvolňují aglykony z glykosidových nebo glukuronidovaných forem. [114,115,116] Tyto enzymy jsou produkovány přítomnými bakteroidy. Struktura metabolitů produkováných v kolonu není závislá na sacharidovém zbytku, ale na struktuře aglykonu.

Na modelu založeném na Caco-2 buňkách byl studován transport klíčových antioxidantů z třešně (*Prunus cerasus* L.) přes intestinální epiteliální bariéru. [117] Antokyany a (-)-epikatechin byly dodávány ve třech odlišných podobách: ovoce, zpracovaná šťáva, frakce polyfenolů získaná extrakcí na pevné fázi. Transport přes vrstvu epiteliálních buněk byl u antokyanů z ovoce nebo šťávy srovnatelný. V porovnání s nimi měla frakce polyfenolů účinnost nižší. Další látky ve šťávě (sacharóza a kyselina citrónová), které jsou pravidelně přidávány do zpracovávaných potravin, mají pozitivní efekt na stabilitu a transport antokyanů. Výsledky tedy ukazují důležitost i ostatních složek potravy pro intestinální absorpci fenolů. [117]

Biodostupnost polyfenolů může být ovlivněna interakcemi se stěnami rostlinných buněk. K těm může docházet buď během přípravy potravy nebo jejího žvýkání. [118] Vazebné interakce mezi antokyany, fenolickými kyselinami a polysacharidy stěn buněk byly zhodnoceny za použití bakteriálního modelového systému celulóza-pektin a dále systému pyrů z černé karotky. Většina dostupných fenolů se vážala na buněčné stěny materiálu z 60 – 70%. Uvolnění již navázaných polyfenolů za použití okyseleného metanolu bylo nízké, přibližně se uvolnilo 20% celkových antokyanů a 30% fenolických kyselin. Méně než 2% vázaných polyfenolů bylo uvolněno po *in vitro* žaludečním a střevním trávení, a to v obou modelech. Velmi podobné znaky vazby u antokyanů a fenolických kyselin naznačují, že fenolické

kyseliny tvoří komplexy s antokyany a polysacharidy. Časově závislé změny v extrahování do okyseleného metanolu, ale nikoli celkové vázané frakce naznačují, že počáteční nescifická depozice na povrchu celulózy je následována přeskupením vázaných molekul. Minimální uvolnění antokyanů a fenolických kyselin po simulovaném žaludečním a střevním trávení ukazuje, že polyfenoly v ovoci a zelenině, které se váží na buněčné stěny rostlin, budou transportovány až do tlustého střeva. Zde se dá očekávat jejich uvolnění za přispění bakterií degradujících buněčné stěny. [118]

Analýza pomocí LC-MS/MS odhalila, že metabolity antokyanů se hojně vykytují v moči (n=17) i po pěti dnech konzumace stravy, která už antokyany neobsahovala. [69] Po příjmu 250 ml borůvkového džusu představovaly původní antokyany 4% a jejich metabolity 96% celkového množství antokyanů v moči po následujících 24 hodin. Přetrvávání metabolitů antokyanů naznačuje enterohepatální oběh, který vede k prolongované přítomnosti antokyanů. Zjištěna byla přítomnost metabolitů založených na pelargonidinu, který ale není v borůvkovém džusu přítomen. To může ukazovat na pokračující dehydroxylaci a demetylaci ostatních antokyanů prostřednictvím xenobiotického a bakteriálního působení. [69]

Byl studován transmembránový transport různých flavonoidů (flavan-3-olů, antokyanů a flavonolů) a některých jejich metabolitů (metylovaných nebo konjugovaných s glukuronovou kyselinou) přes hCMEC/D3 buňky (model hematoencefalické bariéry). [119] Všechny flavonoidy a jejich metabolity byly transportovány skrz hCMEC/D3 buňky v závislosti na čase, vyšší schopnost průchodu vykazovaly obecně metabolity než nativní flavonoidy. Uvnitř buněk nebyla pozorována žádná další biotransformace metabolitů. Antokyany a jejich metabolity prostupovaly skrz tento model hematoencefalické bariéry v závislosti na lipofilitě. Transport flavonolu kvercetinů byl ovlivněn fosfatázovými modulátory, předpokládá se regulace pomocí fosforylace/defosforylace. Výsledky této studie naznačují, že antokyany jsou schopné přestoupit hematoencefalickou bariéru a dostat se do nervové soustavy. [119]

6.7.3. Metabolity

Ve studii se značeným izotopem uhlíku bylo nalezeno celkem 25 ¹³C-začtených sloučenin, které se skládaly z ¹³C₅- cyanidin-3-glukosidu a 24 značených metabolitů. [68] Zahrnovaly konjugáty II. fáze cyanidin-3-glukosidu a cyanidinu (cyanidin-

glukuronid, metylcyanidin-glukuronid a metylcyanidin-3-glukosid-glukuronid), degradační produkty (protokatechová kyselina, floroglucinaldehyd), konjugáty II.fáze kyseliny protokatechové (3-glukuronid, 4-glukuronid, 3-sulfát, 4-sulfát, vanilová kyselina, izovanilová kyselina, glukuronidy vanilové a izovanilové kyseliny, sulfáty vanilové a izovanilové kyseliny, metyl-3,4-dihydroxybenzoát, 2-hydroxy-4-metoxybenzoová kyselina a metylvanilát), fenyloctové kyseliny (3,4-dihydroxyfenyloctová a 4-hydroxyfenyloctová), fenypropenové kyseliny (kávová a ferulová) a hippurovou kyselinu. [68]

Byla zjištěna také značná interindividuální variabilita ve výtěžku ^{13}C [68], která se pohybovala mezi 15,1 a 99,3%. Pravděpodobně je to výsledek odlišností v délce trvání průchodu žaludkem a střevy, složením a katabolickou aktivitou bakteriální flóry a schopností přijímat a vylučovat katabolity a metabolity.

Celkově bylo ve studii získáno $43,9 \pm 25,9\%$ podané dávky ^{13}C a to v moči, dechu a stolici. Osud zbylého podaného ^{13}C zůstává neznámý. [68]

Metabolity antokyanů byly dále stanoveny ve vzorcích odebraných po 12-týdenní intervenční studii provedené se zdravými ženami po menopauze. [120] Pomocí HPLC-ESI-MS/MS byly analyzovány vzorky moči a prázdné plazmy odebrané po 1,2 a 3 hodinách po podání bolusové dávky (akutní expozice) a dále chronického podávání (suplementace antokyanů po dobu 12 týdnů, denní dávka 500 mg). V moči bylo po akutním podání identifikováno 28 metabolitů (z toho 17 fenolů a 11 konjugátů antokyanů) a v plazmě 21 (17 fenolů a 4 konjugáty antokyanů); metabolity nalezené v moči a plazmě se navzájem lišily.

Plazma obsahovala aldehydy (4-hydroxybenzaldehyd a 3,4-dihydroxybenzaldehyd), benzoové kyseliny (2-hydroxy-4-metoxybenzoová kyselina a 4-sulfát benzoové kyseliny) a metylderiváty. Všechny uvedené metabolity v moči nalezeny nebyly. V moči bylo v porovnání s plazmou nalezeno více konjugátů antokyanů (sulfáty, glukuronidy a metylované konjugáty), skořicové kyseliny (*p*-kumarová a sinapová), fenyloctové kyseliny; 3,5-dihydroxybenzoová kyselina a 4-hydroxybenzylalkohol. Všechny tyto uvedené konjugáty se ve vzorcích plazmy nevyskytovaly. [120] Konjugáty fenolických degradačních produktů antokyanů se v oběhu objevily už za 1 hodinu po konzumaci. Zřejmě tedy nemají stejný eliminační profil jako jiné flavonoidy (kvercetin, epikatechin), které vyžadují bakteriální

katabolismus k uvolnění fenolů a v oběhu jsou proto mnohem později. Pravděpodobně je to způsobeno nestabilitou antokyanů ve fyziologickém pH, která vede k jejich rychlé degradaci a metabolismu v tenkém střevě. [120]

Strukturální odlišnost metabolitů v plazmě a moči by mohla být způsobena tím, že některé z nich by pravděpodobně mohly být dále metabolizovány v jiných tkáních nebo eliminovány žlučí a dále metabolizovány koloniální mikroflórou a resorbovány či exkretovány.

Degradační produkty cyanidin-3-glukosidu (kyselina protokatechová a floroglucinaldehyd) byly detekovány jak v moči, tak v plazmě.

Bylo nalezeno také mnoho nekonjugovaných metabolitů antokyanů – protokatechová kyselina, *p*-kumarová kyselina a homoprotokatechová kyselina. Přestože se obecně předpokládá, že metabolity flavonoidů se v cirkulaci vyskytují v podobě konjugátů, nekonjugované fenolické kyseliny jakožto metabolity antokyanů byly v této studii nalezeny v podobných hladinách. [120]

U lidí bylo po podání šťávy z červeného pomeranče a ostružin nalezeno v plazmě 30-44% zkonsumovaného cyanidin-3-glukosidu ve formě protokatechové kyseliny. [121,122]

Dále byl určen peak koncentrace v plazmě a v moči - v obou případech dosáhly mnohem vyšší koncentrace metabolity než konjugáty antokyanů. Nebylo prokázáno, že by chronická expozice měla vliv jak na profil, tak na množství získaných metabolitů v porovnání k akutní expozici. [120]

Pouze 0,02% podaného cyanidin-3-glukosidu bylo v krvi nalezeno v původní formě. Podobně i 4-hydroxybenzoová kyselina (metabolit pelargonidin-3-glukosidu) představovala 54-56% pelargonidin-3-glukosidu z jahod zkonsumovaných dobrovolníky. [123]

Vysoké koncentrace metabolitů v podobě fenolických kyselin jsou v rozporu s nízkými koncentracemi jim odpovídajících antokyanů. Není tedy zcela jasné, zda jsou fenolické kyseliny produkovány v lumen zažívacího traktu ještě předtím než jsou absorbovány, nebo až po absorpci. [86]

Již dříve se soudilo, že antokyaniny jsou jedny z nejméně dostupných sloučenin z celé skupiny flavonoidů přijímaných potravou (přibližně 0,4%). Nová data ale naznačují, že jsou dostupné stejně jako jiné flavonoidy, například flavan-3-oly a flavony, jejichž relativní biodostupnost se pohybuje mezi 2,5 a 18,5%. [68]

7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

7.1. Použitý materiál

V experimentální části byl stanoven obsah antokyanů v plodech sedmnácti vybraných kultivarů černého bezu (*Sambucus nigra* L.). Plody pocházely z rostlin pěstovaných ve Výzkumném a šlechtitelském ústavu ovocnářském Holovousy s.r.o., rok sběru 2011 a 2013. Plody byly po sběru okamžitě zamrazeny a v tomto stavu uchovávány po celou dobu až do provedení analýzy. Před provedením analýzy byly pomocí pinzety ze zmrazených plodů odstraněny případné drobné zbytky větviček a lístků, následně byly plody mechanicky rozmělněny v laboratorní třence.

sběr 2011 a 2013

sběr 2013:

Allesö

Aurea

Bohatka

Albida

Haschberg

Dana

Mammut

Heidegg 13

Sambo

Körsör

Sambu

Pregarten

Samdal

Riese aus Vobloch

Sampo

Samyl

Weihenstephan

Vzorky planého bezu pocházely ze 3 různých keřů (planý bez I - lokalita Holovousy, planý bez II - Sezemice, planý bez III – Hradec Králové).

Stanovení antokyanů v plodech během postupného dozrávání bylo provedeno na plodech sklizených z rostliny vyskytující se na volném prostranství u rybníka nedaleko Sezemic (planý bez II).

Zralé a nezralé plody porovnávané pro obsah antokyanů pocházely z rostliny vyskytující se na slunečné zahradě v Hradci Králové (planý bez III)

7.2. Přístroje

Analytické váhy Kern (Německo)

Spektrofotometr Shimadzu (Japonsko)

Ultrazvuková lázeň Bandolin Sonorex (Německo)

7.3. Použité chemikálie

Metanol p. a., Penta, Chrudim, ČR

Kyselina chlorovodíková p. a., Penta, Chrudim, ČR

7.4. Postup stanovení obsahu antokyanů v plodech

Postup stanovení antokyanů byl dle Českého lékopisu 2009, článek *Myrtilli fructus recens*. [124] Stanovení se provádělo se 3 navážkami vzorku, použity byly zmrazené plody černého bezu.

Příprava měřeného roztoku

Asi 5,00 g zmrazených plodů zbavených stopek se důkladně rozmělnilo v třence, smíchalo s 95 ml metanolu a extrahovalo se za obvyčejné teploty 30 minut na ultrazvukové lázni. Poté se zfiltrovalo do 100,0 ml odměrné baňky. Filtr se promyl metanolem a výluh se doplnil metanolem do 100,0 ml. Z tohoto výluhu se odebral 1,0 ml a připravilo se padesátinásobné zředění ve směsi objemových dílů kyseliny chlorovodíkové a metanolu R (1+999).

Měření absorpance

Absorbance připraveného roztoku byla měřena při 528 nm za použití směsi objemových dílů kyseliny chlorovodíkové R a metanolu R (1+999) jako kontrolní tekutiny. Z naměřených hodnot se vypočítal obsah antokyanů v procentech.

Vzorec pro výpočet obsahu antokyanů

$$\% = \frac{A \times 5000}{718 \times m}$$

A absorbance zkoušeného roztoku při 528 nm

m hmotnost zkoušené drogy v g

718 specifická absorbance cyanidin-3-*O*-glukosid-chloridu při 528 nm

Výsledky stanovení obsahu antokyanů jsou uvedeny v tabulkách 5-33 a grafech 1-8.

Obsah antokyanů počítán jako cyanidin 3-*O*-glukosid-chlorid byl zjištěn v plodech zmrazených a přepočten na plody vysušené.

7.5. Ztráta sušením

Stanovení ztráty sušením bylo provedeno postupem dle Českého lékopisu. Navážka asi 5,0000 g zmrazených plodů byla sušena v sušárně do konstantní hmotnosti, výsledné hodnoty jsou uvedeny v tabulkách 1., 2., 3. a 4.

8. VÝSLEDKY

8.1. Ztráta sušením

Tab. 1. : pěstované kultivary

Odrůda	Navážka plodů [g]	Ztráta sušením [%]	Obsah sušiny [%]
Albida	4,9219	83,9	16,1
Allesö	4,8657	73,2	26,8
Aurea	4,97305	80,05	19,95
Bohatka	5,0018	84,2	15,8
Dana	4,683	69,9	30,1
Haschberg	4,9895	79,5	20,5
Heidegg 13	5,0589	80,8	19,2
Körsör	5,0282	72,4	27,6
Mammut	4,934	71,9	28,1
Pregarten	4,9182	77,01	22,9
Riese aus Vobloch	4,901	75,3	24,7
Sambo	4,999	65,5	34,5
Sambu	4,9272	82,3	17,7
Samdal	4,9446	80,4	19,6
Sampo	4,8789	82,4	17,6
Samyl	4,9178	76,1	23,9
Weihenstephan	4,9827	72,5	27,5

Tab. 2.: planý bez I, sběr 11.9.2013

Vzorek	Navážka plodů [g]	Ztráta sušením [%]	Obsah sušiny [%]
Planý bez I, 11.9.13	5,0838	80,1	19,9

Tab.3.: planý bez II, postupné dozrávání

Vzorek	Navážka plodů [g]	Ztráta sušením [%]	Obsah sušiny [%]
Planý bez II, 19.8.13	5,0682	74,9	25,1
Planý bez II, 22.8.13	5,0161	78,5	21,5
Planý bez II, 28.8.13	5,0116	68,9	31,1
Planý bez II, 5.9.13	4,8875	80,4	19,6
Planý bez II, 13.9.13	4,8876	73,3	26,7

Tab.4.: planý bez III, srovnání 2 různě zralých vzorků sklizených ve stejný den 9.9.2013

Vzorek	Navážka plodů [g]	Ztráta sušením [%]	Obsah sušiny [%]
Planý bez III, zralé	4,9893	55,3	44,7
Planý bez III, nezralé	4,9044	51,3	48,7

8.2. Obsah antokyanů v plodech - kulturní odrůdy bezu

Tab. 5.: odrůda Albida

n	m [g]	A [-]	obsah AC [%]	Obsah antokyanů [%] ve zmrazených plodech	Obsah antokyanů [%] po přepočtení na vysušené plody
1	5,044	0,045	0,062	0,062	0,386±0,002
2	4,9934	0,045	0,063		
3	5,0914	0,045	0,062		

Tab. 6.: odrůda Allesö

n	m [g]	A [-]	obsah AC [%]	Obsah antokyanů [%] ve zmrazených plodech	Obsah antokyanů [%] po přepočtení na vysušené plody
1	4,9655	0,582	0,816	0,84±0,02	3,12±0,07
2	4,933	0,618	0,872		
3	4,958	0,581	0,816		

Tab. 7.: odrůda Aurea

n	m [g]	A [-]	obsah AC [%]	Obsah antokyanů [%] ve zmrazených plodech	Obsah antokyanů [%] po přepočtení na vysušené plody
1	4,9871	0,307	0,429	0,46± 0,02	2,3±0,1
2	5,0366	0,33	0,456		
3	4,8809	0,354	0,505		

Tab. 8.: odrůda Bohatka

n	m [g]	A [-]	obsah AC [%]	Obsah antokyanů [%] ve zmrazených plodech	Obsah antokyanů [%] po přepočtení na vysušené plody
1	5,0364	0,454	0,628	0,60±0,01	3,80±0,08
2	4,9286	0,414	0,585		
3	4,969	0,422	0,591		

Tab. 9.: odrůda Dana

n	m [g]	A [-]	obsah AC [%]	Obsah antokyanů [%] ve zmrazených plodech	Obsah antokyanů [%] po přepočtení na vysušené plody
1	4,974	0,383	0,536	0,54±0,01	1,79±0,05
2	4,9713	0,403	0,565		
3	5,0808	0,378	0,518		

Tab. 10.: odrůda Haschberg

n	m [g]	A [-]	obsah AC [%]	Obsah antokyanů [%] ve zmrazených plodech	Obsah antokyanů [%] po přepočtení na vysušené plody
1	4,9953	0,396	0,552	0,58±0,02	2,8±0,1
2	4,9285	0,439	0,620		
3	5,0881	0,42	0,575		

Tab. 11.: odrůda Heidegg 13

n	m [g]	A [-]	obsah AC [%]	Obsah antokyanů [%] ve zmrazených plodech	Obsah antokyanů [%] po přepočtení na vysušené plody
1	4,9775	0,497	0,695	0,73±0,02	3,8±0,1
2	5,0129	0,546	0,758		
3	5,0137	0,532	0,739		

Tab. 12.: odrůda Körsör

n	m [g]	A [-]	obsah AC [%]	Obsah antokyanů [%] ve zmrazených plodech	Obsah antokyanů [%] po přepočtení na vysušené plody
1	4,9978	0,494	0,688	0,73±0,04	2,6±0,1
2	5,0165	0,579	0,804		
3	4,9952	0,496	0,691		

Tab. 13.: odrůda Mammut

n	m [g]	A [-]	obsah AC [%]	Obsah antokyanů [%] ve zmrazených plodech	Obsah antokyanů [%] po přepočtení na vysušené plody
1	4,9327	0,772	1,090	0,96±0,07	3,4±0,2
2	4,953	0,625	0,879		
3	4,8897	0,642	0,914		

Tab. 14.: odrůda Pregarten

n	m [g]	A [-]	obsah AC [%]	Obsah antokyanů [%] ve zmrazených plodech	Obsah antokyanů [%] po přepočtení na vysušené plody
1	4,9999	0,287	0,400	0,38±0,2	1,7±0,1
2	4,9531	0,288	0,405		
3	5,0011	0,245	0,341		

Tab. 15.: odrůda Riese aus Vobloch

n	m [g]	A [-]	obsah AC [%]	Obsah antokyanů [%] ve zmrazených plodech	Obsah antokyanů [%] po přepočtení na vysušené plody
1	4,907	0,539	0,765	0,78±0,01	3,16±0,04
2	5,0033	0,564	0,785		
3	4,9328	0,563	0,795		

Tab. 16.: odrůda Sambo

n	m [g]	A [-]	obsah AC [%]	Obsah antokyanů [%] ve zmrazených plodech	Obsah antokyanů [%] po přepočtení na vysušené plody
1	4,9231	0,531	0,751	0,80±0,03	2,33±0,08
2	5,0046	0,601	0,836		
3	4,9261	0,584	0,826		

Tab. 17.: odrůda Sambu

n	m [g]	A [-]	obsah AC [%]	Obsah antokyanů [%] ve zmrazených plodech	Obsah antokyanů [%] po přepočtení na vysušené plody
1	4,9158	0,425	0,602	0,62±0,01	3,48±0,08
2	4,8091	0,434	0,628		

Tab. 18.: odrůda Samdal

n	m [g]	A [-]	obsah AC [%]	Obsah antokyanů [%] ve zmrazených plodech	Obsah antokyanů [%] po přepočtení na vysušené plody
1	5,0139	0,757	1,051	1,15±0,05	5,9±0,3
2	5,0212	0,856	1,187		
3	5,0251	0,88	1,220		

Tab. 19.: odrůda Sampo

n	m [g]	A [-]	obsah AC [%]	Obsah antokyanů [%] ve zmrazených plodech	Obsah antokyanů [%] po přepočtení na vysušené plody
1	5,0528	0,559	0,770	0,74±0,01	4,23±0,08
2	4,9426	0,518	0,730		
3	4,9264	0,518	0,732		

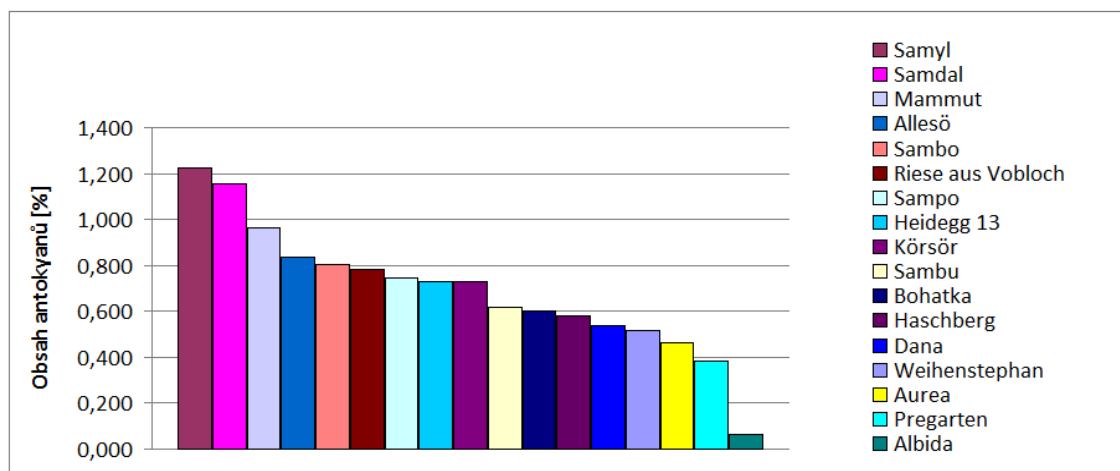
Tab. 20.: odrůda Samyl

n	m [g]	A [-]	obsah AC [%]	Obsah antokyanů [%] ve zmrazených plodech	Obsah antokyanů [%] po přepočtení na vysušené plody
1	5,044	0,865	1,194	1,23±0,03	5,1±0,1
2	4,9209	0,903	1,278		
3	5,0422	0,871	1,203		

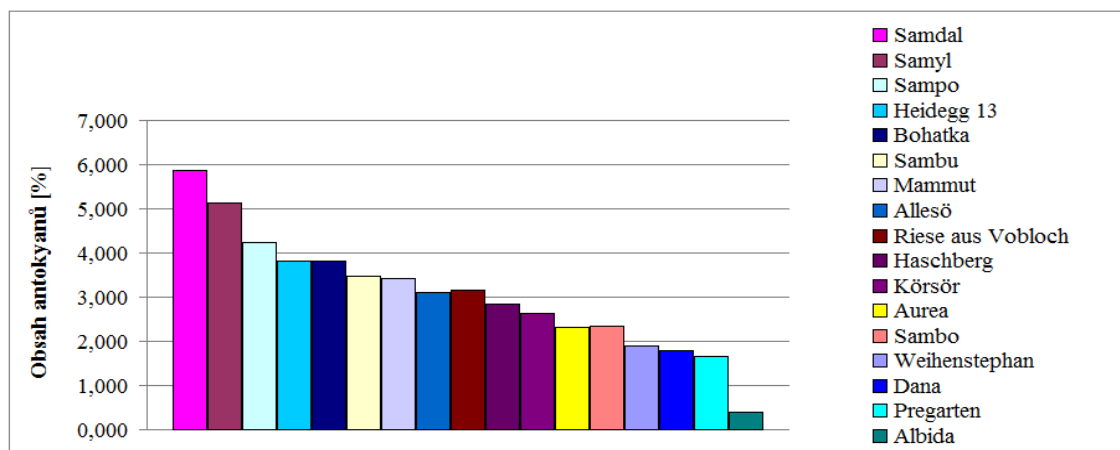
Tab. 21.: odrůda Weihenstephan

n	m [g]	A [-]	obsah AC [%]	Obsah antokyanů [%] ve zmrazených plodech	Obsah antokyanů [%] po přepočtení na vysušené plody
1	4,9873	0,356	0,497	0,52±0,01	1,89±0,05
2	5,0155	0,373	0,518		
3	5,0312	0,391	0,541		

Graf 1.: Obsah antokyanů ve zmražených plodech vybraných pěstovaných odrůd bezu černého.



Graf 2.: Obsah antokyanů v plodech vybraných pěstovaných odrůd bezu černého přepočtený na vysušenou drogu.

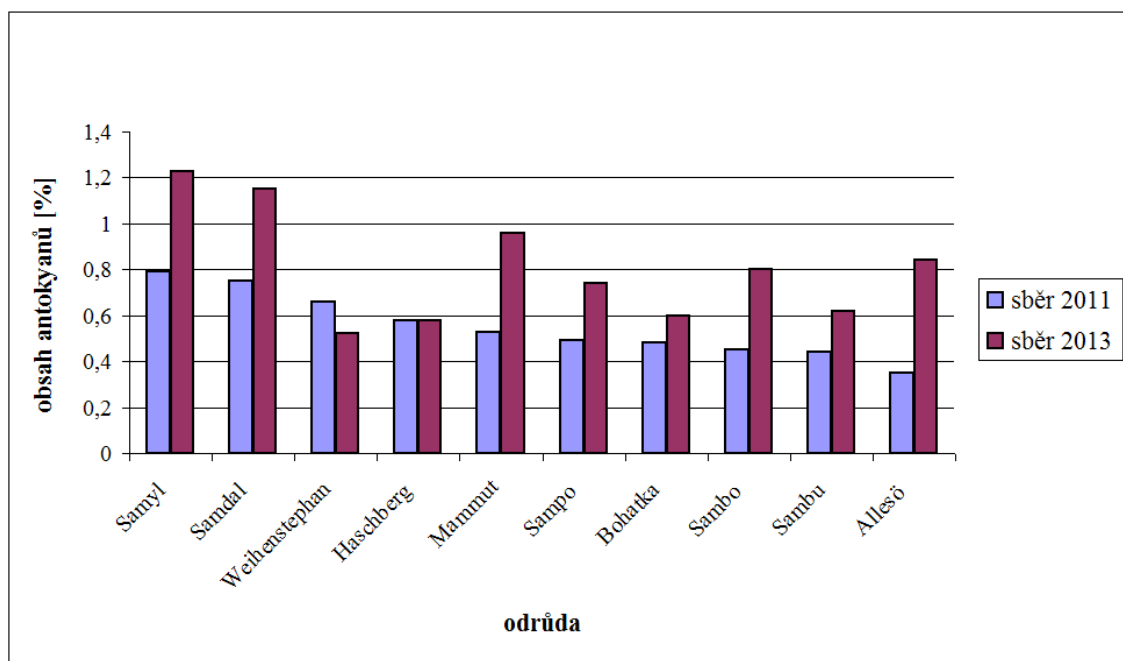


Tab. 22.: Obsah antokyanů v plodech zmrazených a po přepočtení na plody vysušené

Odrůda	Sušina [%]	Obsah antokyanů [%] ve zmrazených plodech	Obsah antokyanů [%] po přepočtení na vysušené plody
Albida	16,1	0,062	0,386±0,002
Allesö	26,8	0,84±0,02	3,12±0,07
Aurea	19,95	0,46±0,02	2,3±0,1
Bohatka	15,8	0,60±0,01	3,80±0,08
Dana	30,1	0,54±0,01	1,79±0,05
Haschberg	20,5	0,58±0,02	2,8±0,1
Heidegg 13	19,2	0,73±0,02	3,8±0,1
Körsör	27,6	0,73±0,04	2,6±0,1
Mammut	28,1	0,96±0,07	3,4±0,2
Pregarten	22,9	0,38±0,2	1,7±0,1
Riese aus Vobloch	24,7	0,78±0,01	3,16±0,04
Sambo	34,5	0,80±0,03	2,33±0,08
Sambu	17,7	0,62±0,01	3,48±0,08
Samdal	19,6	1,15±0,05	5,9±0,3
Sampo	17,6	0,74±0,01	4,23±0,08
Samyl	23,9	1,23±0,03	5,1±0,1
Weihenstephan	27,5	0,52±0,01	1,89±0,05

8.3. Srovnání sběru 2011 a 2013

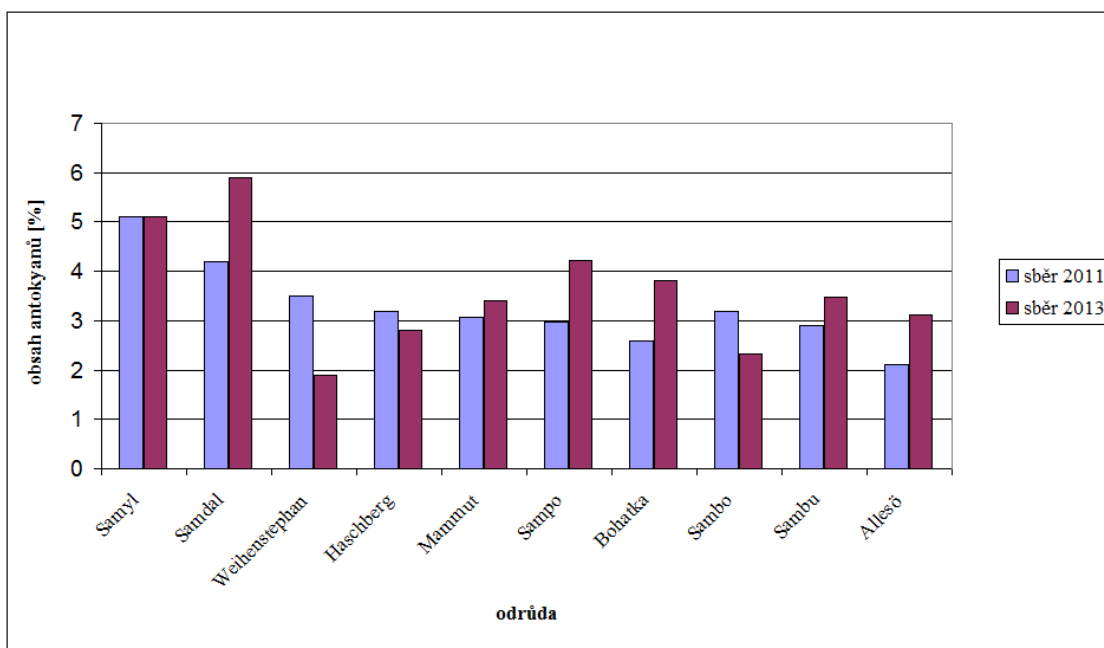
Graf 3.: Obsah antokyanů ve zmrazených plodech ze sběru r. 2011 a 2013.



Tab. 23.: Obsah antokyanů ve zmrazených plodech ze sběru r. 2011 a 2013.

Odrůda	Obsah antokyanů [%], rok sběru 2011	Obsah antokyanů [%], rok sběru 2013
Allesö	0,35±0,03	0,84±0,02
Bohatka	0,48±0,02	0,60±0,01
Haschberg	0,58±0,04	0,58±0,02
Mammut	0,530±0,004	0,96±0,07
Sambo	0,45±0,03	0,80±0,03
Sambu	0,44±0,02	0,62±0,01
Samdal	0,75±0,02	1,15±0,05
Sampo	0,49±0,02	0,74±0,01
Samyl	0,79±0,02	1,23±0,03
Weihenstephan	0,66±0,02	0,52±0,01

Graf 4.: Obsah antokyanů po přepočtení na vysušené plody ze sběru r. 2011 a 2013.



Tab. 24.: Obsah antokyanů po přepočtení na vysušené plody ze sběru r. 2011 a 2013.

Odrůda	Obsah antokyanů [%], rok sběru 2011	Obsah antokyanů [%], rok sběru 2013
Allesö	2,1±0,2	3,12±0,07
Bohatka	2,6±0,2	3,80±0,08
Haschberg	3,2±0,3	2,8±0,1
Mammut	3,07±0,03	3,4±0,2
Sambo	3,2±0,2	2,33±0,08
Sambu	2,9±0,2	3,48±0,08
Samdal	4,20±0,07	5,9±0,3
Sampo	2,97±0,09	4,23±0,08
Samyl	5,1±0,2	5,1±0,1
Weihenstephan	3,50±0,06	1,89±0,05

8.4. Obsah antokyanů v plodech - planý bez

Tab. 25.: planý bez I (11.9. 2013)

n	m [g]	A [-]	obsah AC [%]	Obsah antokyanů [%] ve zmrazených plodech	Obsah antokyanů [%] po přepočtení na vysušené plody
1	4,9731	0,323	0,452	0,47±0,01	2,35±0,05
2	4,97	0,344	0,482		
3	5,039	0,341	0,471		

Tab. 26.: planý bez II (19.8.2013)

n	m [g]	A [-]	obsah AC [%]	Obsah antokyanů [%] ve zmrazených plodech	Obsah antokyanů [%] po přepočtení na vysušené plody
1	4,9068	0,07	0,099	0,09±0,01	0,37±0,03
2	4,9974	0,057	0,079		
3	4,9128	0,068	0,096		

Tab. 27.: planý bez II (22.8.2013)

n	m [g]	A [-]	obsah AC [%]	Obsah antokyanů [%] ve zmrazených plodech	Obsah antokyanů [%] po přepočtení na vysušené plody
1	5,007	0,054	0,075	0,077±0,001	0,36±0,01
2	4,9311	0,055	0,078		
3	4,8625	0,054	0,077		

Tab. 28.: planý bez II (28.8. 2013)

n	m [g]	A [-]	obsah AC [%]	Obsah antokyanů [%] ve zmrazených plodech	Obsah antokyanů [%] po přepočtení na vysušené plody
1	5,0339	0,251	0,347	0,36±0,03	1,2±0,1
2	5,0097	0,232	0,322		
3	4,9405	0,297	0,419		

Tab. 29.: planý bez II (5.9.2013)

n	m [g]	A [-]	obsah AC [%]	Obsah antokyanů [%] ve zmrazených plodech	Obsah antokyanů [%] po přepočtení na vysušené plody
1	4,9804	0,171	0,239	0,25±0,01	1,27±0,04
2	4,9377	0,186	0,262		
3	4,9938	0,177	0,247		

Tab. 30.: planý bez II (13.9.2013)

n	m [g]	A [-]	obsah AC [%]	Obsah antokyanů [%] ve zmrazených plodech	Obsah antokyanů [%] po přepočtení na vysušené plody
1	4,9803	0,18	0,252	0,28±0,02	1,03±0,05
2	5,0544	0,216	0,298		
3	4,9631	0,198	0,278		

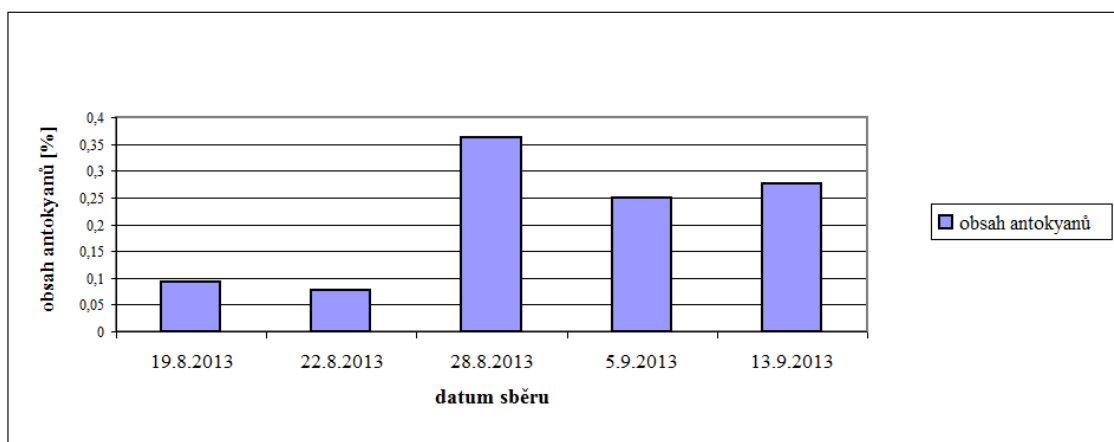
Tab. 31.: planý bez III - zralé vzorky (9.9.2013)

n	m [g]	A [-]	obsah AC [%]	Obsah antokyanů [%] ve zmrazených plodech	Obsah antokyanů [%] po přepočtení na vysušené plody
1	4,9393	0,558	0,787	0,77±0,02	1,73±0,04
2	5,0188	0,566	0,785		
3	4,9893	0,532	0,743		

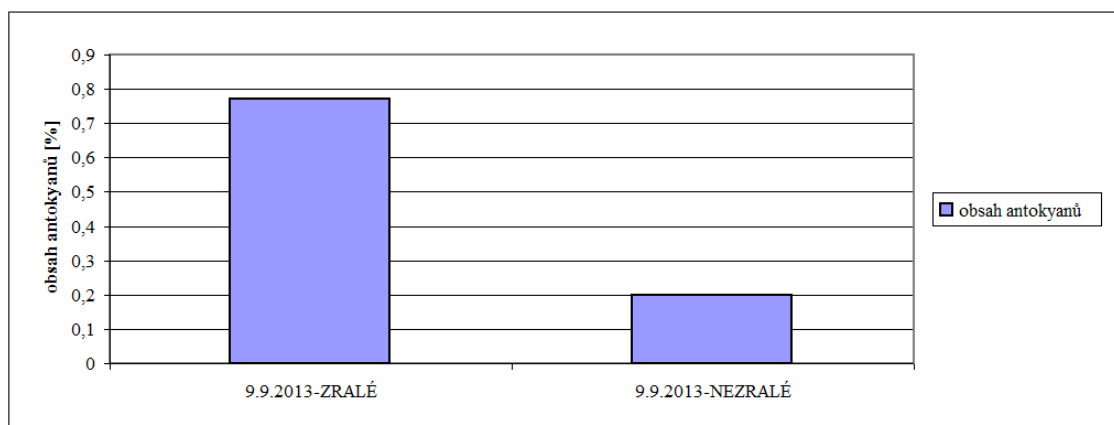
Tab. 32.: planý bez III - nezralé vzorky (9.9.2013)

n	m [g]	A [-]	obsah AC [%]	Obsah antokyanů [%] ve zmrazených plodech	Obsah antokyanů [%] po přepočtení na vysušené plody
1	4,977	0,142	0,199	0,2±0,1	0,41±0,05
2	4,959	0,165	0,232		
3	5,0389	0,118	0,163		

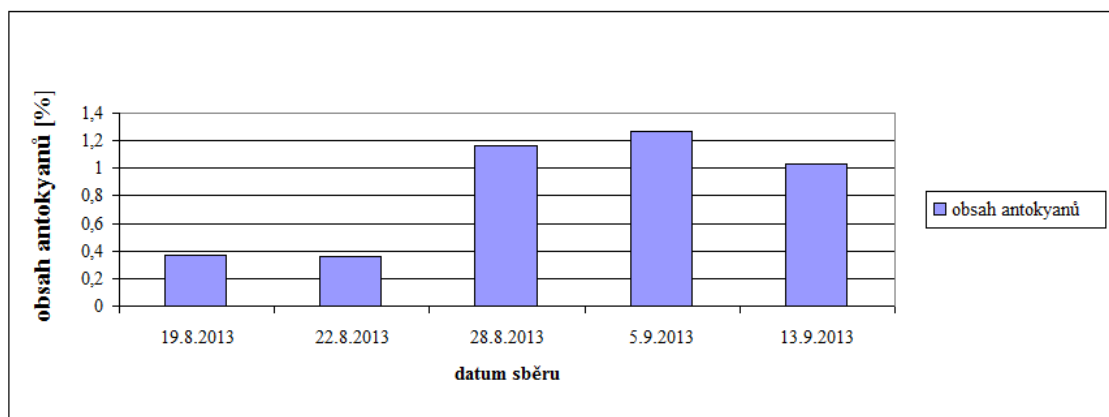
Graf 5.: Obsah antokyanů ve zmrazených plodech planého bezu během postupného dozrávání plodů (planý bez II).



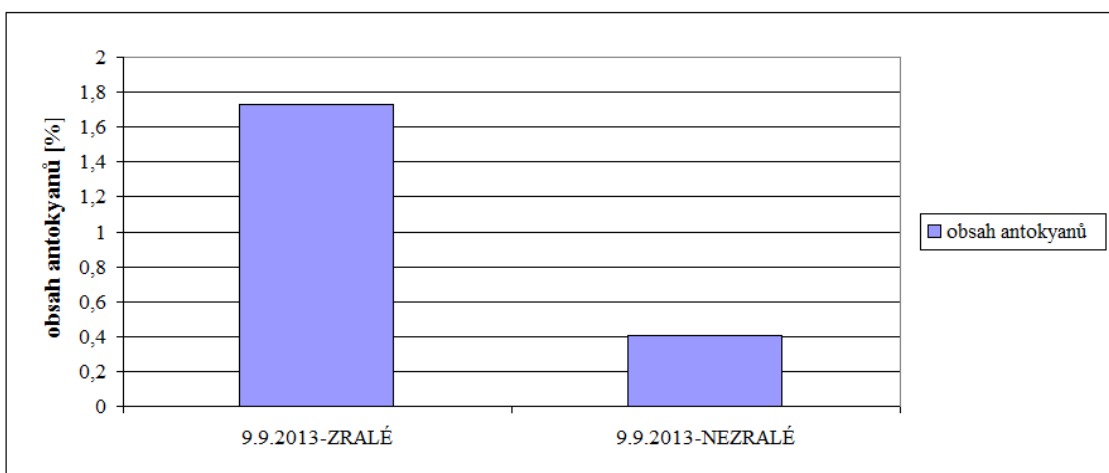
Graf 6.: Srovnání obsahu antokyanů ve zmrazených zralých a nezralých plodech sklizených v jeden den ze stejného keře (planý bez III).



Graf 7.: Obsah antokyanů v plodech planého bezu během postupného dozrávání plodů po přepočtení na vysušené plody (planý bez II)



Graf 8.: Srovnání obsahu antokyanů ve zralých a nezralých plodech sklizených v jeden den ze stejného keře po přepočtení na vysušené plody (planý bez III).



Tab. 33.: Obsah antokyanů v plodech zmrazených a po přepočtení na plody vysušené.

Sběr	Sušina [%]	Obsah antokyanů [%] ve zmrazených plodech	Obsah antokyanů [%] po přepočtení na vysušené plody
11.9.2013 (planý bez I)			
	19,9	0,47±0,01	2,35±0,05
Postupné zrání (planý bez II)			
19.8.2013	25,1	0,09±0,01	0,37±0,03
22.8.2013	21,5	0,077±0,001	0,36±0,01
28.8.2013	31,1	0,36±0,03	1,2±0,1
5.9.2013	19,6	0,25±0,01	1,27±0,04
13.9.2013	26,7	0,28±0,02	1,03±0,05
Srovnání 2 vzorků (planý bez III)			
9.9.2013-ZRALÉ	44,7	0,77±0,02	1,73±0,04
9.9.2013-NEZRALÉ	48,7	0,2±0,1	0,41±0,05

9. DISKUZE

To, že se v přírodě vyskytuje celá řada rostlin s příznivými účinky na lidské zdraví, je známo a v lidové medicíně využíváno již od nepaměti. V dřívějších dobách byly léčivé rostliny používány v léčbě nejrůznějších chorob jen na základě zkušenosti a tradice, bez znalosti obsahových látek rostlin a mechanismu jejich působení na člověka. Přestože dnes už jsou vědci schopni syntetizovat ohromné množství zcela chemických sloučenin s léčebnými účinky, léčivé rostliny mají v terapii stále své důležité místo a v některých případech mohou být před chemickými léčivy i upřednostňovány. Současná věda se však snaží o charakterizaci jednotlivých účinných látek a objasnění mechanismu jejich působení.

Významnou skupinou obsahových látek rostlin z hlediska příznivých účinků na zdraví člověka jsou antokyany. Tato ve vodě rozpustná barviva patří mezi polyfenolické sloučeniny, vyskytují se ve většině pozemních rostlin a jsou zodpovědná za charakteristická zbarvení květů, listů a plodů. Vysoký výskyt antokyanů byl nalezen u tmavého drobnoplodého ovoce, jako je černý bez, aronie, maliny, ostružiny, černý a červený rybíz nebo borůvka. Odborníci se zaměřují především na jejich vysokou antioxidační aktivitu a možnosti jejího využití v léčbě kardiovaskulárních, metabolických nebo nádorových onemocnění.

Přírodním zdrojům antokyanů jako antioxidantů je v dnešní době věnována významná pozornost. Mezi studovanými plody jsou i plody černého bezu. Plody bezu jsou zpracovávány zejména v potravinářském průmyslu. Jsou ale také jedním z bohatých zdrojů antokyanů, flavonoidů a dalších polyfenolů. Předmětem výzkumu jsou plody pocházející nejen z planě rostoucích keřů, ale především z kulturně pěstovaných odrůd, které obsahují vysoké množství antokyanů a dalších biologicky aktivních látek. Plody pěstovaných odrůd mají velmi temně fialovou až černou barvu. Vyšlechtěny byly i okrasné kultivary s plody například světle zelenými (kultivar Albida), které antokyany prakticky neobsahují.

Antokyany, které lze považovat za nejcennější obsahové látky plodů, mají řadu velmi významných účinků, které byly ověřeny testy *in vitro*, *in vivo* (především na potkanech), i studiemi u lidí [23,27,28,33] Kromě antioxidační aktivity jsou to účinky na kardiovaskulární systém, kostní tkáň, protinádorové působení nebo ovlivnění

metabolických poruch. Dále pak účinky protizánětlivé, imunomodulační a pak také působení protivirové a antibakteriální. Studie biodostupnosti antokyanů ukazují, že antokyany a jejich metabolity mají příznivý vliv na bakterie střevní mikroflóry. [125] S ohledem na poznatky o biologické aktivitě antokyanů a také antokyanů izolovaných z bezinek se plody ukazují jako levný a dobře dostupný zdroj terapeuticky významných látek. V současnosti je vyšlechtěna již řada kultivarů černého bezu, jejichž analýza byla předmětem mé práce.

Stanovení obsahu antokyanů bylo provedeno spektrofotometricky ve výluhu připraveném ze zmrazených plodů sedmnácti vyšlechtěných kultivarů bezu černého (*Sambucus nigra* L.). Použila jsem validovaný lékopisný postup pro stanovení antokyanů v čerstvých plodech borůvky *Myrtilli fructus recens*. [124] Extrakce probíhala metanolem 95% v ultrazvukové lázni za pokojové teploty. Stabilita výluhu byla zajištěna okyselením HCl. Obsah antokyanů byl vyjádřen v procentech jako cyanidin-3-*O*-glukosid-chlorid a přepočítán na plody vysušené. Dále byl stejným postupem stanoven obsah antokyanů v plodech tří planých bezů pocházejících z různých stanovišť. U jednoho ze vzorků byl sledována změna obsahu antokyanů v plodech během jejich postupného dozrávání.

Obsah antokyanů v plodech jednotlivých kultivarů je v tab. 5 až 21. Zmrazené plody obsahují až 80% vody [tab. 1] Po přepočtení na vysušenou drogu bylo možné srovnávat množství antokyanů v jednotlivých kultivarech. Výsledky stanovení ukázaly, že jednotlivé kultivary se množstvím antokyanů v plodech liší a potvrzují tak závěry jiných autorů. [8,15,17] Nejvyšší množství antokyanů obsahoval po přepočtení na vysušené plody kultivar Samdal (5,9%), následovaný byl kultivarem Samyl (5,1%). [tab. 22, graf 2] Mezi kultivary s nejnižším obsahem antokyanů patřily Pregarten (1,7%), Dana (1,79%) a Weihenstephan (1,89%). Téměř žádné antokyany neobsahoval kultivar Albida, který se vyznačuje téměř bezbarvými plody. Porovnáním obsahu antokyanů v plodech sebraných roku 2011 jsem zjistila, že oba kultivary Samyl i Samdal patří stále mezi nejbohatší z hlediska obsahu antokyanů. [tab. 24 , graf 4] Ostatní kultivary měly obsah antokyanů v porovnání s předchozím sběrem odlišný, z výsledků se ale nedá určit jednotný trend změny obsahu antokyanů v plodech. Podle naměřených výsledků u některých kultivarů obsah antokyanů v plodech během dvou let poklesl (Weihenstephan, Haschberg, Sambo), u jiných kultivarů se naopak zvýšil (Samdal, Mammut, Sampo, Bohatka, Sambu, Allesö). [tab. 24 , graf 4]

Na obsah antokyanů v plodech má vliv stupeň zralosti plodů a sklizeň, proto je velmi cenné, že všech 17 vzorků bylo pěstováno za stejných podmínek na stejném stanovišti. Sběr byl proveden v průběhu srpna a září 2013, na keřích byly vybrány vzhledově nejbohatší, stejnoměrně a plně vyzrálé vrcholíky. To samozřejmě při velkoprodukcí není možné dodržet. I přes to, pěstované kultivary se vyznačují rovnoměrností v dozrávání plodů. [4] U plodů analyzovaných v této práci byl v maximální možné míře omezen vliv lokality na kvalitu plodů. Množství antokyanů může být ovlivněno například nadmořskou výškou, složením půdy, množstvím slunečního záření a také srážkovým režimem v době vegetace. [4,13,17] Podmínky pěstování ovlivňují tvorbu a akumulaci látek v plodech. [16] Ihned po sběru byly plody zmrazeny a uchovávány ve zmrazeném stavu (-18°C) do zahájení extrakce. Množství antokyanů se v různých částech plodů liší, v oplodí bezu je antokyanů více než v dužině. U planého bezu to může být až 80 % celkového množství antokyanů, u pěstovaných kultivarů je v oplodí více než polovina celkového množství. [126] Je proto potřeba věnovat rozdrobnění plodů a jejich extrakci velkou pozornost.

Analyzované plody pocházející z planě rostoucích rostlin se obsahem antokyanů také lišily a obecně měly antokyanů méně než kultivary pěstované. [tab. 33] Žádný z analyzovaných plodů planých bezů neobsahoval stejně vysoké množství antokyanů jako kultivary Samdal a Samyl, nejvyšší naměřená hodnota (2,35% přepočteno na vysušené plody, planý bez I) [tab. 25,33] se při srovnání s vyšlechtěnými kultivary pohybuje spíše mezi rostlinami na antokyanu chudšími. Během postupného dozrávání plodů byl pozorován postupný nárůst obsahu antokyanů až do hodnoty 1,27% (planý bez II, sběr 5.9.2013, přepočteno na vysušené plody), následně obsah antokyanů klesl. [tab. 26-30,33; graf 7] Plody pocházející ze stejné rostliny nedozrávají rovnoměrně. Je možno sesbírat plody téměř nezralé s obsahem antokyanů jen 0,41% při přepočtení na vysušenou drogu a současně plody výrazně tmavě zbarvené, u kterých se obsah antokyanů pohybuje kolem 1,7%. [tab. 31,32,33; graf 8] To může ztížit sběr a následné zpracování plodů, protože pro dosažení co nejvyšší kvality šťávy s vysokým množstvím antokyanů by bylo potřeba plody třídit.

Bez pěstovaný v kulturách obsahuje vyšší množství antokyanů než bez planý. Kvalita plodů z planých rostlin může být navíc ovlivněna řadou faktorů. Plody z pěstovaných kultivarů analyzované v této práci pocházely z rostlin pěstovaných ve stejné lokalitě a za stejných podmínek. Rozdíly mezi odrůdami tedy nejsou dány environmentálními faktory. Volbou vhodného stanoviště a podmínek pěstování lze

dosáhnout vyšších výnosů, rovnoměrnějšího dozrání plodů na jedné rostlině a především vyššího obsahu biologicky účinných látek v plodech. Plody z pěstovaných rostlin tak mohou být zdrojem kvalitní drogy *Sambuci fructus* využitelné v medicíně a farmacii.

10. ZÁVĚR

Cílem mojí práce bylo stanovit obsah antokyanů v plodech vybraných pěstovaných kultivarů bezu černého (*Sambucus nigra* L.) a podat přehled nových poznatků o jejich biologické aktivitě a metabolismu u člověka. Dále porovnat obsah antokyanů v plodech pěstovaných a sklizených v roce 2011 s plody ze sklizně v roce 2013. Dalším cílem bylo zjistit obsah antokyanů v plodech planého bezu během postupného dozrávání plodů.

Plody černého bezu obsahují řadu biologicky aktivních látek a jsou již tradičně využívány v lidové medicíně. Nejvýznamnějšími obsahovými látkami jsou antokyaniny, které vykazují silnou antioxidační aktivitu a mohou být proto potenciálně využity v terapii kardiovaskulárních, metabolických nebo nádorových onemocnění. Zjištěno bylo, že mají i účinky protizánětlivé, protiinfekční a dále jejich příznivé působení na kostní tkáň a nervovou soustavu.

Obsah antokyanů byl stanoven spektrofotometricky v plodech sedmnácti pěstovaných kultivarů bezu černého a dále v plodech planého bezu pocházejícího ze tří odlišných stanovišť. Stanovení bylo provedeno se zmrazenými plody, výsledky byly přepočítány na plody vysušené a vyjádřeny v procentech jako cyanidin-3-*O*-glukosid-chlorid.

Obsah antokyanů se u jednotlivých kultivarů lišil. Nejvyšší hodnoty byly naměřeny u kultivaru Samdal (5,9% přepočteno na vysušenou drogu) a Samyl (5,1% přepočteno na vysušenou drogu). Při srovnání výsledků získaných ze sběru z roku 2011 se ukázalo, že tyto kultivary patřily z hlediska obsahu antokyanů opět mezi nejbohatší. Kultivar Samyl měl obsah antokyanů stejný jako v roce 2011, kultivar Samdal měl nyní obsah antokyanů vyšší (4,2% sběr 2011; 5,9% sběr 2013). Mezi kultivary s nejnižším obsahem antokyanů patřily Pregarten (1,7%), Dana (1,79%), Weihenstephan (1,89%) a především Albida, která se vyznačuje téměř bezbarvými plody a obsahovala jen 0,386% antokyanů při přepočtení na vysušené plody. Obsah antokyanů se u většiny ostatních plodů pohyboval mezi 2% a 5% při přepočtení na vysušenou drogu. Srovnáním sběru 2011 a 2013 se ukázalo, že obsah antokyanů v plodech se u konkrétních kultivarů od předešlé hodnoty liší, z výsledků však nelze určit jednotný trend změny množství antokyanů v plodech.

Obsah antokyanů v plodech planých bezů se u jednotlivých rostlin opět lišil. Při sledování plodů během postupného dozrávání byl zaznamenán postupný vzrůst obsahu antokyanů až do hodnoty 1,27% (planý bez II, sběr 5.9.2013, přepočteno na vysušené plody), následně obsah antokyanů klesl. Žádný z analyzovaných planých bezů neobsahoval tak vysoké množství antokyanů jako bylo naměřeno u nejbohatších kulturních odrůd Samyl nebo Samdal. Nejvyšší naměřená hodnota (2,35% přepočteno na vysušené plody, planý bez I) odpovídá z hlediska obsahu antokyanů spíše chudším pěstovaným kultivarům. Dále bylo zjištěno, že na jedné rostlině je možno sesbírat plody téměř nezralé s obsahem antokyanů jen 0,41% při přepočtení na vysušenou drogu a současně plody výrazně tmavě zbarvené, u kterých se obsah antokyanů pohybuje kolem 1,7%.

Výsledky ukázaly, že plody z planě rostoucích rostlin obsahují obecně menší množství antokyanů než kulturní odrůdy bezu. Na jedné rostlině se také vyskytují jak plody téměř nezralé, které obsahují minimální množství antokyanů, tak plody zralé, zbarvené. Bez pěstovaný v kulturách obsahuje vyšší množství antokyanů než bez planý. Volbou vhodného stanoviště a podmínek pěstování lze dosáhnout rovnoměrnějšího dozrávání plodů na jedné rostlině. Jednotlivé kultivary se množstvím antokyanů lišily, ale vzhledem k tomu, že plody pocházely z rostlin pěstovaných ve stejné lokalitě, nepodílí se na těchto rozdílech environmentální faktory. Plody z pěstovaných rostlin bohaté na obsah antokyanů by se mohly stát zdrojem kvalitní drogy *Sambuci fructus*, využitelné v medicíně a farmacii pro biologické účinky obsahových látek.

11. POUŽITÉ ZKRATKY

AC	antokyany
AMPK	proteinkináza aktivovaná adenosinmonofosfátem (adenosine monophosphate activated proteinkinase)
AP1	aktivační protein 1 (activator protein 1)
cAMP-PKA-eNOS	cyklickým adenosinmonofosfátem aktivované proteinkinázy a endoteliální syntázy oxidu dusnatého
CYP1A1	cytochrom P450 1A1 (cytochrome P450 1A1)
ER- α	estrogenový receptor alfa (estrogen receptor alpha)
GALT	se střevem asociovaná lymfoidní tkáň (gut-associated lymphoid tissue)
GLUT1, 2	glukózový transportér 1, 2 (glucose transporter 1, 2)
GLUT2mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina pro glukózový transportér 2 (glucose transporter 2 messenger ribonucleic acid)
IgA, E	imunoglobuliny A, E (immunoglobulines A, E)
IL 4, 13	interleukiny 4, 13
MAP kinázy	mitogenem aktivované proteinkinázy (mitogen-activated protein kinases)
NF kappa B	nukleární faktor kappa B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
NK buňky	přirození zabíječi (natural killer cells)
NRF2	nukleární faktor 2 (nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2)
OAT2	transportér organických aniontů 2 (organic anion transporter 2)
RAST test	radioalergosorbent test (radioallergosorbent test)
ROS	reaktivní kyslíkové radikály (reactive oxygen species)
SGLT1mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina pro transportér glukózy spojený se sodíkem (sodium-dependent glucose cotransporter messenger ribonucleic acid)
SMCT1, 2	se sodíkem spojený transportér pro laktát a mastné kyseliny s krátkým řetězcem 1, 2 (sodium-coupled monocarboxylate transporters)

Th2 buňky

pomocné T-lymfocyty typu 2 (T helper type 2)

12. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Slavík B. a kol.: Květena České republiky 5. vyd. Praha: Academia 1997; s. 504-506
- [2] Hemgesberg H.: Černý bez a naše zdraví. Olomouc: Fontána 2002.
- [3] Matthioli P.O.: Herbář, jinak bylinář velmi užitečný. (Tadeáš Hájek z Hájku). 1.vyd. Praha: Odeon 1982; s. 312-315
- [4] Matějček A., Kaplan J., Matějčková J, Vespalcová M.: Metodika pěstování kulturních odrůd bezu černého. Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o. 2013
- [5] Kaplan J., Matějček A.: Černý bez v produkčním ovocnářství – II. díl. Zahradnictví 2011; 10 (9), 18-21
- [6] Thomas A.L., Byers P.L., Ellersieck M.R.: Productivity and Characteristics of American Elderberry in Response to Various Pruning Methods. Hortscience 2009; 44(3), 671-677
- [7] Leharová E.: Anthokyany v plodech vybraných kultivarů *Sambucus nigra* L. I. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2014
- [8] Veveřic R., Jerneja J., Stampar F., Schmitzer V.: European elderberry (*Sambucus nigra*) rich in sugars, organic acids, anthocyanins and selected polyphenols. Food Chem. 2009; 114, 511-515
- [9] Bühringová U.: Léčivé rostliny. Obsahové látky, zpracování, základní recepty. 1.vyd. Praha: Euromedia Group, k.s. – Knižní klub 2010; s. 218-221
- [10] Kolar J., Malbeck J.: Levels of Antioxidant melatonin in fruits of edible berry species. Planta Med 2009; 75- PJ42
- [11] Jimenez P., Cabrero P., Basterrechea J.E., Tejero J., Cordoba-Diaz D., Cordoba-Diaz M., Girbes T.: Effects of Short-term Heating on Total Polyphenols, Anthocyanins, Antioxidant Activity and Lectins of Different Parts of Dwarf Elder (*Sambucus ebulus* L.). Plant Food Hum. Nutr. 2014; 69(2), 168-174
- [12] Mikulic-Petkovsek M., Schmitzer V., Slatnar A., Stampar F., Veberic R.: Composition of Sugars, Organic Acids, and Total Phenolics in 25 Wild or Cultivated Berry Species. J. Food Sci. 2012; 77(10), C1064-C1070

- [13] Rieger R., Müller M., Guttenberger H., Bucar F.: Influence of altitudinal variation on the content of phenolic compounds in wild populations of *Calluna vulgaris*, *Sambucus nigra*, and *Vaccinium myrtillus*. *J. Agric. Food Chem.* 2008; 56(19), 9080-9086
- [14] Ochmian I., Oszmiansky J., Skupien K.: Chemical composition, phenolics, and firmness of small black fruits. *J. Appl. Bot. Food Qual.-Angew. Bot.* 2009; 83(1), 64-69
- [15] Jordheim M., Giske N. H., Andersen O. M.: Anthocyanins in *Caprifoliaceae*. *Biochem. Syst. Ecol.* 2007; 35(3), 153-159
- [16] Mikulic-Petkovsek M., Schmitzer V., Slatnar A., Todorovic B., Veberic R., Stampar F., Ivancic A.: Investigation of Anthocyanin Profile of Four Elderberry Species and Interspecific Hybrids. *J. Agric. Food Chem.* 2014; 62(24), 5573-5580
- [17] Labun P., Fejér J., Šalamon I., Ragác P.: Study of content and composition of anthocyanins in selected plants species. *Planta Med* 2011, 77-PL68
- [18] Abdala S., Devora S., Martin-Herrera D., Perez-Paz P.: Antinociceptive and anti-inflammatory activity of *Sambucus palmensis* link, an endemic Canary Island species. *J. Ethnopharmacol.* 2014; 155(1), 626-632
- [19] Li L., Wang L., Wu Z.: Anthocyanin-rich fractions from red raspberries attenuate inflammation in both RAW264.7 macrophages and a mouse model of colitis. *Sci. Rep.* 2014; 4: 6234
- [20] Lee S.G., Kim B., Yang Y., Pham T.X., Park Y.K., Manatou J.E., Koo S.I., Chun O.K., Lee J.Y.: Berry anthocyanins suppress the expression and secretion of proinflammatory mediators in macrophages by inhibiting nuclear translocation of NF-kappa B independent of NRF2-mediated mechanism. *J. Nutr. Biochem.* 2014; 25(4), 404-411
- [21] Graf D., Seifert S., Bub A., Frohling B., Dold S., Unger F., Rompp A., Watzl B.: Anthocyanin-rich juice does not affect gut-associated immunity in Fischer rats. *Mol. Nutr. Food Res.* 2013; 57(10), 1753-1761
- [22] Wright O.R.L., Netzel G.A., Sakzewski A.R.: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of the effect of dried purple carrot on body mass, lipids, blood pressure, body composition, and inflammatory markers in overweight and obese adults: The QUENCH Trial. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2013; 91(6), 480-488
- [23] McAnulty L.S., Collier S.R., Landram M.J., Whittaker D.S., Isaacs S.E., Klemka J.M., Cheek S.L., Arms J.C., McAnulty S.R.: Six weeks daily ingestion of whole

- blueberry powder increases natural killers cell counts and reduces arterial Stiffness in sedentary males and females. *Nutr. Res.* 2014; 34(7), 577-584
- [24] Zhang Y.H., Wang X.M., Wang Y., Liu Y., Xia M.: Supplementation of Cyanidin-3-O-beta-Glucoside Promotes Endothelial Repair and Prevents Enhanced Atherogenesis in Diabetic Apolipoprotein E-Deficient Mice. *J. Nutr.* 2013; 143(8), 1248-1253
- [25] Jennings A., Welch A.A., Fairweather-Tait S.J., Kay C., Minihane A.M., Chowienczyk P., Jiang B.Y., Cecelja M., Spector T., Macgregor A.: Higher anthocyanin intake is associated with lower arterial stiffness and central blood pressure in women. *Am. J. Clin. Nutr.* 2012; 96(4), 781-788
- [26] Liu Y., Li D., Zhang Y.H., Sun R.F., Xia M.: Anthocyanin increases adiponectin secretion and protects against diabetes-related endothelial dysfunction. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 2014; 306(8), E975-E988
- [27] Kaume L., Gbur E.E., DiBrezza R., Howard L.R., Devareddy L.: Antioxidant-rich berries exert modest bone protective effects in postmenopausal smokers without improving biomarkers of bone metabolism. *J. Funct. Food.* 2014; 9, 202-210
- [28] Handeland M., Grude N., Torp T., Slimestad R.: Black chokeberry juice (*Aronia melanocarpa*) reduces incidences of urinary tract infection among nursing home residents in the long term- a pilot study. *Nutr. Res.* 2014; 34(6), 518-525
- [29] Kinoshita E., Hayashi K., Katayama H., Hayashi T., Obata A.: Anti-Influenza Virus Effects of Elderberry Juice and Its Fractions. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2012; 76(9), 1633-1638
- [30] Parkar S.G., Redgate E.L., McGhie T.K., Hurst R.D.: In vitro studies of modulation of pathogenic and probiotic bacterial proliferation and adhesion to intestinal cells by blackcurrant juices. *J. Funct. Food.* 2014; 8, 35-44
- [31] Nikolaeva-Glomb L., Mukova L., Nikolova N., Badjakov I., Dincheva I., Kondakova V., Doumanova L., Galabov A.S.: In Vitro Antiviral Activity of a Series of Wild Berry Fruit Extracts against Representatives of Picorna-, Orthomyxo- and Paramyxoviridae. *Nat. Prod. Commun.* 2014; 9(1), 51-54
- [32] Yang H.S., Hewes D., Salaheen S., Federman C., Biswas D.: Effects of blackberry juice on growth inhibition of foodborne pathogens and growth promotion of *Lactobacillus*. *Food Control* 2014; 37, 15-20
- [33] Kardum N., Konic-Ristic A., Savikin K., Spasic S., Stefanovic A., Ivanisevic J., Miljkovic M.: Effects of Polyphenol-Rich Chokeberry Juice on Antioxidant/Pro-Oxidant Status in Healthy Subjects. *J. Med. Food* 2014; 17(8), 869-874

- [34] Wangensteen H., Braunlich M., Nikolic V., Malterud K.E., Slimestad R., Barsett H.: Anthocyanins, proanthocyanidins and total phenolics in four cultivars of aronia: Antioxidant and enzyme inhibitory effects. *J. Funct. Food.* 2014; 7, 746-752
- [35] Oprea E., Manolescu B.N., Farcasanu I.C., Mladin P., Mihele D.: Studies concerning antioxidant and hypoglycaemic activity of Aronia melanocarpa fruits. *Farmacia* 2014; 62(2), 254-263
- [36] Slemmer J.E., Livingston-Thomas J.M., Gottchall-Pass K.T., Sweeney M.I.: Cranberries and Wild Blueberries Treated with Gastrointestinal Enzymes Positively Modify Glutathione Mechanisms in Caco-2 Cells In Vitro. *J. Food Sci.* 2013; 78(6), H943-H947
- [37] Anton A.M., Pintea A.M., Rugina D.O., Sconta Z.M., Hanganu D., Vlase L., Benedec D.: Preliminary studies on the chemical characterization and antioxidant capacity of polyphenols from Sambucus sp. *Dig. J. Nanomater. Biostruct.* 2013; 8(3), 973-980
- [38] Toydemir G., Capanoglu E., Kamiloglu S., Boyacioglu D., de Vos R.Ch., Hall R.D., Beekwilder J.: Changes in sour cherry (*Prunus cerasus* L.) antioxidants during nectar processing and in vitro gastrointestinal digestion. *J. Funct. Food.* 2013; 5(3), 1402-1413
- [39] Strathearn K.E., Yousef G.G., Grace M.H., Roy S.L., Tambe M.A., Ferruzzi M.G., Wu Q.L., Simon J.E., Lila M.A., Rochet J.C.: Neuroprotective effects of anthocyanin- and proanthocyanidin-rich extracts in cellular models of Parkinson's disease. *Brain Res.* 2014; 1555, 60-77
- [40] Harris C.S., Cuerrier A., Lamont E., Haddad P.S., Arnason J.T., Bennett S.A.L., Johns T.: Investigating Wild Berries as a Dietary Approach to Reducing Formation of Advanced Glycation Endproducts: Chemical Correlates of In Vitro Antiglycation Activity. *Plant Food Hum. Nutr.* 2014; 69(1), 71-77
- [41] Stefanut M.N., Cata A., Pop R., Tanaise C., Boc D., Ienascu I., Ordodi V.: Anti-hyperglycemic Effect of Bilberry, Blackberry and Mulberry Ultrasonic Extracts on Diabetic Rats. *Plant Food Hum. Nutr.* 2013; 68(4), 378-384
- [42] Graf D., Seifert S., Jaudszus A., Bub A., Watzl B.: Anthocyanin-Rich Juice Lowers Serum Cholesterol, Leptin, and Resistin and Improves Plasma Fatty Acid Composition in Fischer Rats. *PLoS One* 2013; 8(6): UNSP e66690

- [43] Fan J.F., Johnson M.H., Lila M.A., Yousef G., de Meja E.G.: Berry and Citrus Phenolic Compounds Inhibit Dipeptidyl Peptidase IV: Implications in Diabetes Management. *Evid.-based Complement Altern. Med.* 2013; 479505
- [44] Boath A.S., Stewart D., McDougall G.J.: Berry components inhibit alpha-glucosidase in vitro: Synergies between acarbose and polyphenols from black currant and rowanberry. *Food Chem.* 2012; 135(3), 929-936
- [45] Alzaid F., Cheung H.M., Preedy V.R., Sharp P.A.: Regulation of Glucose Transporter Expression in Human Intestinal Caco-2 Cells following Exposure to an Anthocyanin-Rich Berry Extract. *PLoS One* 2013; 8(11): e78932
- [46] Kurimoto Y., Shibayama Y., Inoue S., Soga M., Takikawa M., Ito C., Nanba F., Yoshida T., Yamashita Y., Ashida H., Tsuda T.: Black Soybean Seed Coat Extract Ameliorates Hyperglycemia and Insulin Sensitivity via the Activation of AMP-Activated Protein Kinase in Diabetic Mice. *J. Agric. Food Chem.* 2013; 61(23), 5558-5564
- [47] Mykkanen O.T., Kalesnykas G., Adriaens M., Evelo C.T., Torronen R., Kaarniranta K.: Bilberries potentially alleviate stress-related retinal gene expression induced by a high-fat diet in mice. *Mol. Vis.* 2012; 18(247), 2338-2351
- [48] Jeyabalan J., Aqil F., Munagala R., Annamalai L., Vadhanam M.V., Gupta R.C.: Chemoprotective and Therapeutic Activity of Dietary Blueberry against Estrogen-Mediated Breast Cancer. *J. Agric. Food Chem.* 2014; 62(18), 3963-3971
- [49] Iriti M., Varoni E.M.: Chemoprotective Potential of Flavonoids in Oral Squamous Cell Carcinoma in Human Studies. *Nutrients* 2013; 5(7), 2564-2576
- [50] Förster-Waldl E., Marchetti M., Schöll I., Focke M., Radauer C., Kinaciyan T., Nentwich I., Jäger S., Schmid E.R., Boltz-Nitulescu G., Scheiner O., Jensen-Jarolim E.: Type I allergy to elderberry (*Sambucus nigra*) is elicited by a 33.2 kDa allergen with significant homology to ribosomal inactivating proteins. *Clin. Exp. Allergy* 2003; 33, 1703-1710
- [51] Van Damme E.J., Roy S., Barre A., Rougé P., Van Leuven F., Peumans W.J.: The major elderberry (*Sambucus nigra*) fruit protein is a lectin derived from a truncated type 2 ribosome-inactivating protein. *Plant J.* 1997; 12(6), 1251-1260
- [52] Haas H., Falcone F.H., Schramm G., Haisch K., Gibbs B.F., Klaucke J., Poppelman M., Becker W.M., Gabius H.J., Schlaak M.: Dietary lectins can induce in vitro release of IL-4 and IL-13 from human basophils. *Eur. J. Immunol.* 1999; 29(3), 918-927

- [53] Vandebussche F., Desmyter S., Ciani M., Proost P., Peumans W.J., Van Damme E.J.M.: Analysis of the in planta antiviral activity of elderberry ribosome-inactivating proteins. *Eur J Biochem* 2004; 271(8), 1508-1515
- [54] Chen Y., Peumans W.J., Van Damme E.J.M.: The *Sambucus nigra* type-2 ribosome-inactivating protein SNA-I' exhibits in planta antiviral activity in transgenic tobacco. *FEBS Letters* 2002; 516(1-3), 27-30
- [55] Citores L., Ferreras J.M., Munoz R., Benitez J., Jimenez P., Girbes T.: Targeting cancer cells with transferrin conjugates containing the non-toxic type 2 ribosome-inactivating proteins nigrin b or ebulin 1. *Cancer Lett.* 2002; 184(1), 29-35
- [56] Boeing J.S., Barizao E.E.O., Silva B.C.E., Montanher P.F., Almeida V.D., Visentainer J.V.: Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. *Chemistry Central Journal* 2014; 8: 48
- [57] Kopjar M., Orsollic M., Pilizota V.: Anthocyanins, Phenols, and Antioxidant Activity of Sour Cherry Puree Extracts and their Stability During Storage. *Int. J. Food Prop.* 2014; 17(6), 1393-1405
- [58] Kiss A., Rapi S., Korozs M., Forgo P.: Elaboration of Novel Extraction Procedure to Reveal Bioactive Component Profile of Anthocyanin-Rich Plants. *Czech. J. Food Sci.* 2014; 32(4), 384-390
- [59] Jimenez P., Cabrero P., Basterrechea J.E., Tejero J., Cordoba-Diaz D., Cordoba-Diaz M., Girbes T.: Effects of Short-term Heating on Total Polyphenols, Anthocyanins, Antioxidant Activity and Lectins of Different Parts of Dwarf Elder (*Sambucus ebulus* L.). *Plant Food Hum. Nutr.* 2014; 69(2), 168-174
- [60] Veberic R., Stampar F., Schmitzer V., Cunja V., Zupan A., Koron D., Mikulic-Petkovsek M.: Changes in the Contents of Anthocyanins and Other Compounds in Blackberry Fruits Due to Freezing and Long-Term Frozen Storage. *J. Agric. Food Chem.* 2014; 62(29), 6926-6935
- [61] Gustafson S.J., Yousef G.G., Grusak M.A.: Lila M.A.: Effect of postharvest handling practises on phytochemical concentrations and bioactive potential in wild blueberry fruit. *Journal of Berry Research* 2012; 2, 215-227
- [62] Hellström J., Mattila P., Karjalainen R.: Stability of anthocyanins in berry juices stored at different temperatures. *J. Food Compos. Anal.* 2013; 31(1), 12-19
- [63] Casati C.B., Sánchez V., Baeza R., Magnani N., Evelson P., Zamora M.C.: Relationships between colour parameters, phenolic content and sensory changes of

- processed blueberry, elderberry and blackcurrant commercial juices. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2012; 47, 1728-1736
- [64] Radvanyi D., Juhasz R., Kun S., Szabo-Notin B., Barta J.: Preliminary study of extraction of biologically active compounds from elderberry (*Sambucus nigra* L.) pomace. *Acta Aliment.* 2013; 42, 63-72
- [65] Pogorzelski E.: Studies on the formation of histamine in must and wines from elderberry fruit. *J. Sci. Food Agric.* 1992; 60, 239-244
- [66] Sadilova E., Stintzing F.C., Carle R.: Thermal degradation of acylated and Nonacylated Anthocyanins. *J. Food Sci.* 2006; 71, C504-C512
- [67] Sadilova E., Carle R., Stintzing F.C.: Thermal degradation of anthocyanins and its impact on color and *in vitro* antioxidant capacity. *Mol. Nutr. Food Res.* 2007; 51, 1461-1471
- [68] Czank Ch., Cassidy A., Zhang Q., Morrison D.J., Preston T., Kroon P.A., Botting N.P., Kay C.D.: Human metabolism and elimination of the anthocyanin, cyanidin-3-glucoside: a ¹³C-tracer study. *Am. J. Clin. Nutr.* 2013; 97, 995-1003
- [69] Kalt W., Liu Y., McDonald J.E., Vinqvist-Tymchuk M.R., Fillmore S.A.E.: Anthocyanin Metabolites are Abundant and Persistent in Human Urine. *J. Agric. Food Chem.* 2014; 62(18), 3926-3934
- [70] Woodward G.M., Needs P.W., Kay C.D.: Anthocyanin derived phenolic acid form glucuronides following simulated gastrointestinal digestion and microsomal glucuronidation. *Mol. Nutr. Food Res.* 2011; 55(3), 378-386
- [71] Aqil F., Vadhanam M.V., Jeyabalan J., Cai J., Singh I.P., Gupta R.C.: Detection of Anthocyanins/Anthocyanidins in Animal Tissues. *J. Agric. Food Chem.* 2014; 62(18), 3912-3918
- [72] Cao G.H., Muccitelli H.U., Sanchez-Moreno C., Prior R.L.: Anthocyanins are absorbed in glycosylated forms in elderly women: a pharmacokinetic study. *Am. J. Clin. Nutr.* 2001; 73(5), 920-926
- [73] Cao G., Prior R.L.: Anthocyanins are detected in human plasma after oral administration of an elderberry extract. *Clin. Chem.* 1999; 45, 574-576
- [74] Milbury P.E., Cao G.H., Prior R.L., Blumberg J.: Bioavailability of elderberry anthocyanins. *Mech. Ageing Dev.* 2002; 123(8), 997-1006
- [75] Mulleder U., Murkovic M., Pfannhauser W.: Urinary excretion of cyanidin glycosides. *J. Biochem. Biophys. Methods* 2001; 53(1-3), 61-66

- [76] Talavera S., Felgines C., Texier O., Besson C., Gil-Izquierdo A., Lamaison J.L., Remesy C.: Anthocyanin metabolism in rats and their distribution to digestive area, kidney, and brain. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53(10), 3902-3908
- [77] Kalt W., Blumberg J.B., McDonald J.E., Vinqvist-Tymchuk M.R., Fillmore S.A.E., Graf B.A., O'Leary J.M., Milbury P.E.: Identification of anthocyanins in the liver, eye, and brain of blueberry-fed pigs. *J. Agric. Food Chem.* 2008; 56(3), 705-712
- [78] Felgines C., Texier O., Garcin P., Besson C., Lamaison J.L., Scalbert A.: Tissue distribution of anthocyanins in rats fed a blackberry anthocyanin-enriched diet. *Mol. Nutr. Food Res.* 2009; 53(9), 1098-1103
- [79] Mallery S.R., Budendorf D.E., Larsen M.P., Pei P., Tong M., Holpuch A.S., Larsen P.E., Stoner G.D., Fields H.W., Chan K.K.: Effects of Human Oral Mucosa Tissue, Saliva, and Oral Microflora on Intraoral Metabolism and Bioactivation of Black Raspberry Anthocyanins. *Cancer Prev. Res.* 2011; 4(8), 1209-1221
- [80] Passamonti S., Vrhovsek U., Vanzo A., Mattivi F.: The stomach as a site for anthocyanins absorption from food. *FEBS Letters* 2003; 544(1-3), 210-213
- [81] Talavera S., Felgines C., Texier O., Besson C., Lamaison J.L., Remesy C.: Anthocyanins are efficiently absorbed from the stomach in anesthetized rats. *J. Nutr.* 2003; 133(12), 4178-4182
- [82] El Mohsen M.A., Marks J., Kuhnle G., Moore K., Debnam E., Srari S.K., Rice-Evans C., Spencer J.P.E.: Absorption, tissue distribution and excretion of pelargonidin and its metabolites following oral administration to rats. *Br. J. Nutr.* 2006; 95(1), 51-58
- [83] Felgines C., Talavera S., Texier O., Besson C., Fogliano V., Lamaison J.L., la Fauci L., Galvano G., Remesy C., Galvano F.: Absorption and metabolism of red orange juice anthocyanins in rats. *Br. J. Nutr.* 2006; 95(5), 898-904
- [84] Felgines C., Texier O., Besson C., Lyan B., Lamaison J.L., Scalbert A.: Strawberry pelargonidin glycosides are excreted in urine as intact glycosides and glucuronidated pelargonidin derivatives in rats. *Br. J. Nutr.* 2007; 98(6), 1126-1131
- [85] Felgines C., Texier O., Besson C., Vitaglione P., Lamaison J.L., Fogliano V., Scalbert A., Vanella L., Galvano F.: Influence of glucose on cyanidin 3-glucoside absorption in rats. *Mol. Nutr. Food Res.* 2008; 52(8), 959-964
- [86] Fang J.: Anthocyanins Could Be Efficiently Absorbed across the Gastrointestinal Mucosa: Extensive Presystemic Metabolism Reduces Apparent Bioavailability. *J. Agric. Food Chem.* 2014; 62(18), 3904-3911

- [87] He J., Wallace T.C., Keatley K.E., Failla M.L., Giusti M.M.: Stability of Black Raspberry Anthocyanins in the Digestive Tract Lumen and Transport Efficiency into Gastric and Small Intestinal Tissues in the Rat. *J. Agric. Food Chem.* 2009; 57(8), 3141-3148
- [88] Faria A., Pestana D., Azevedo J., Martel F., de Freitas V., Azevedo I., Mateus N., Calhau C.: Absorption of anthocyanins through intestinal epithelial cells – Putative involvement of GLUT2. *Mol. Nutr. Food Res.* 2009; 53(11), 1430-1437
- [89] Steinert R.E., Ditscheid B., Netzel M., Jahreis G.: Absorption of black currant anthocyanins by monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells mounted in Ussing type chambers. *J. Agric. Food Chem.* 2008; 56(13), 4995-5001
- [90] Yi W.G., Akoh C.C., Fischer J., Krewer G.: Absorption of Anthocyanins from blueberry extracts by Caco-2 human intestinal cell monolayers. *J. Agric. Food Chem.* 2006; 54(15), 5651-5658
- [91] Jaksevic M., Xu J., Aaby K., Jeppsson B., Ahrne S., Molin G.: Effects of Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) in Combination with Lactic Acid Bacteria on Intestinal Oxidative Stress Induced by Ischemia-Reperfusion in Mouse. *J. Agric. Food Chem.* 2013; 61(14), 3468-3478
- [92] Jurgonski A., Juskiwicz J., Zdunczyk Z.: An anthocyanin-rich extract from Kamchatka honeysuckle increases enzymatic activity within the gut and ameliorates abnormal lipid and glucose metabolism in rats. *Nutrition* 2013; 29(6), 898-902
- [93] Battiston L., Macagno A., Passamonti S., Micali F., Sottocasa G.L.: Specific sequence-directed anti-biligranslocase antibodies as a tool to detect potentially bilirubin-binding proteins in different tissues of the rat. *FEBS Letters* 1999; 453(3), 351-355
- [94] Nicolin V., Grill V., Micali F., Narducci P., Passamonti S.: Immunolocalisation of biligranslocase in mucosecretory and parietal cells of the rat gastric mucosa. *J. Mol. Histol.* 2005; 36(1-2), 45-50
- [95] Passamonti S., Vrhovsek U., Mattivi E.: The interaction of anthocyanins with biligranslocase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002; 296(3), 631-636
- [96] Eraly S.A., Bush K.T., Sampogna R.V., Bhatnagar V., Nigam S.K.: The molecular pharmacology of organic anion transporters: from DNA to FDA? *Mol. Pharmacol.* 2004; 65(3), 479-487
- [97] Garcia C.K., Brown M.S., Pathak R.K., Goldstein J.L.: cDNA cloning of MCT2, a 2nd monocarboxylate transporter expressed in different cells than MCT1. *J. Biol. Chem.* 1995; 270(4), 1843-1849

- [98] Yoskihawa T., Inoue R., Matsumoto M., Yajima T., Ushida K., Iwanaga T.: Comparative expression of hexose transporters (SGLT1, GLUT1, GLUT2 and GLUT5) through the mouse gastrointestinal tract. *Histochem. Cell Biol.* 2011; 135(2), 183-194
- [99] Miyazawa T., Nakagawa K., Kudo M., Muraishi K., Someya K.: Direct intestinal absorption of red fruit anthocyanins, cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3,5-diglucoside, into rats and humans. *J. Agric. Food Chem.* 1999; 47(3), 1083-1091
- [100] Talavera S., Felgines C., Texier O., Besson C., Manach C., Lamaison J.L., Remesy C.: Anthocyanins are efficiently absorbed from the small intestine in rats. *J. Nutr.* 2004; 134(9), 2275-2279
- [101] Tsuda T., Horio F., Osawa T.: Absorption and metabolism of cyanidin-3-O-beta-D-glucoside in rats. *FEBS Letters* 1999; 449(2-3), 179-182
- [102] Ichianagi T., Rahman M.M., Kashiwada Y., Ikeshiro Y., Shida Y., Hatano Y., Matsumoto H., Hirayama M., Tsuda T., Konishi T.: Absorption and metabolism of delphinidin 3-O-beta-D-glucopyranoside in rats. *Free Radic. Biol. Med.* 2004; 36(7), 930-937
- [103] Ichianagi T., Shida Y., Rahman M.M., Hatano Y., Konishi T.: Extended glucuronidation is another major path of cyanidin 3-O-beta-D-glucopyranoside metabolism in rats. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53(18), 7312-7319
- [104] Ichianagi T., Shida Y., Rahman M.M., Hatano Y., Matsumoto H., Hirayama M., Konishi T.: Metabolic pathway of cyanidin 3-O-beta-D-glucopyranoside in rats. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53(1), 145-150
- [105] McGhie T.K., Ainge G.D., Barnett L.E., Cooney J.M., Jensen D.J.: Anthocyanin glycosides from berry fruit are absorbed and excreted unmetabolized by both humans and rats. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51(16), 4539-4548
- [106] Hollman P.C., Bijlsman M., van Gameren Y., Cnossen E.P.J., de Vries J.H.M., Katan M.B.: The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radic. Res.* 1999; 31(6), 569-573
- [107] Gee J.M., DuPont M.S., Day A.J., Plumb G.W., Williamson G., Johnson I.T.: Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. *J. Nutr.* 2000; 130(11), 2765-2771
- [108] Woodward G.: Kroon P., Cassidy A., Kay C.: Anthocyanin Stability and Recovery: Implications for the Analysis of Clinical and Experimental Samples. *J. Agric. Food Chem.* 2009; 57(12), 5271-5278

- [109] Williamson G., Clifford M.N.: Colonic metabolism of berry polyphenols: the missing link to biological activity. *Br. J. Nutr.* 2010; 104, S48-S66
- [110] Woodward G.M., Needs P.W., Kay C.D.: Anthocyanin-derived phenolic acids form glucuronides following simulated gastrointestinal digestion and microsomal glucuronidation. *Mol. Nutr. Food Res.* 2011; 55(3), 378-386
- [111] Goldberg D.A., Yan J., Soleas G.J.: Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Clin. Biochem.* 2003; 36(1), 79-87
- [112] Rechner A.R., Smith M.A., Kuhnle G., Gibson G.R., Debnam E.S., Srail S.K.S., Moore K.P., Rice-Evans C.A.: Colonic metabolism of dietary polyphenols: Influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radic. Biol. Med.* 2004; 36(2), 212-225
- [113] Slimestad R., Fossen T., Vagen I.M.: Onions: A source of dietary flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 2007; 55(25), 10067-10080
- [114] Aura A.M., Matin-Lopez P., O'Leary K.A., Williamson G., Oksman-Caldentey K.M., Poutanen K., Santos-Buelga C.: In vitro metabolism of anthocyanins by human gut microflora. *Eur. J. Nutr.* 2005; 44(3), 133-142
- [115] Gonthier M.P., Cheynier V., Donovan J.L., Manach C., Morand C., Mila I., Lapiere C., Remesy C., Scalbert A.: Microbial aromatic acid metabolites formed in the gut account for a major fraction of the polyphenols excreted in urine of rats fed red wine polyphenols. *J. Nutr.* 2003; 133(2), 461-467
- [116] Selma M.V., Espin J.C., Tomas-Barberan F.A.: Interaction between Phenolics and Gut Microbiota: Role in Human Health. *J. Agric. Food Chem.* 2009; 59(15), 6485-6501
- [117] Toydemir G., Boyacioglu D., Capanoglu E., van der Meer I.M., Tomassen M.M.M., Hall R.D., Mes J.J., Beekwilder J.: Investigating the Transport Dynamics of Anthocyanins from Unprocessed Fruit and Processed Fruit Juice from Sour Cherry (*Prunus cerasus* L.) across Intestinal Epithelial Cells. *J. Agric. Food Chem.* 2013; 61, 11434-11441
- [118] Padayachee A., Netzel G., Netzel M., Day L., Mikkelsen D., Gidley M.J.: Lack of release of bound anthocyanins and phenolic acids from carrot plant cell walls and model composites during simulated gastric and small intestinal digestion. *Food Funct.* 2013; 4, 906-916
- [119] Faria A., Meireles M., Fernandes I., Santos-Buelga C., Gonzalez-Manzano S., Duenas M., de Freitas V., Mateus N., Calhau C.: Flavonoid metabolites transport across a human BBB model. *Food Chem.* 2014; 149, 190-196

- [120] de Ferrars R.M., Cassidy A., Curtis P., Kay C.D.: Phenolic metabolites of anthocyanins following a dietary intervention study in post-menopausal women. *Mol. Nutr. Food Res.* 2014; 58, 490-502
- [121] Vitaglione P., Donnarumma G., Napolitano A.: Protocatechuic acid is the major metabolite of cyanidin-glucosides. *J. Nutr.* 2007; 137(9), 2043-2048
- [122] Chen W., Wang D., Wang L.: Pharmacokinetics of protocatechuic acid in mouse and its quantification in human plasma using LC-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 2012; 908, 39-44
- [123] Azzini E., Vitaglione P., Intorre F.: Bioavailability of strawberry antioxidants in human subjects. *Br. J. Nutr.* 2010; 104(8), 1165-1173
- [124] Český lékopis 2009. Praha: Grada Publishing 2009; s. 2669
- [125] Hidalgo M, Oruna-Concha MJ, Kolida S, Walton GE, Kallithraka S, Spencer JP, de Pascual-Teresa S.: Metabolism of anthocyanins by human gut microflora and their influence on gut bacterial growth. *J. Agric. Food Chem.* 2012; 60(15), 3882-3890
- [126] Studená H.: Kontrola kvality drogy *Sambuci fructus* z pěstovaných rostlin. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2014