

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

FARMAKOKINETIKA FLAVANOLOV

Diplomová práce

Vedúci diplomovej práce: doc. PharmDr. Přemysl Mladěnka, Ph.D.

Hradec Králové 2018

Dominika Sobolová

Prehlásenie

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpal, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Táto práca nebola použitá k získaniu iného či rovnakého titulu.“

Dátum:

.....

podpis

Pod'akovanie

Týmto by som sa chcela poďakovať vedúcemu mojej práce, doc. PharmDr. Přemyslovi Mladěnkovi, Ph.D. za odborné vedenie, ochotu, cenné rady a pripomienky pri vypracovaní mojej diplomovej práce.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakológie a toxikológie

Študent: Dominika Sobolová

Školiteľ: doc. PharmDr. Přemysl Mladěnka, Ph.D.

Názov diplomovej práce: Farmakokinetika flavanolov

Táto práca sa zameriava na spracovanie dostupných informácií o osude flavanolov v organizme. Na objasnenie biologických efektov, je potrebné poznať ich farmakokinetiku. Na rozdiel od ostatných flavonoidov sa vyskytujú v rastlinnej potrave v podobe aglykónov. Medzi jednotlivými zástupcami má podstatný vplyv galoylácia, polymerizácia a optická izoméria. Čiastočné vstrebávanie monomérov po perorálnom podaní sa začína v tenkom čreve. Rozsiahle metabolické premeny prebiehajú okrem pečene už v enterocytoch. Vznikajúce metabolity vstupujú do obehu alebo sú vylučované späť do lumen čreva, a to hlavne sulfáty (epi)katechínov. Epikatechín a katechín sú v plazme prítomné takmer výlučne ako glukuronidy, sulfáty alebo metylované zlúčeniny. U galátov naopak prevládajú voľné nekonjugované formy a rozsah absorpcie je nižší. Jediné sa významne vylučujú žlčou, zatiaľ čo ostatné katechíny sú predovšetkým rýchlo eliminované obličkami do moču. Biologická dostupnosť parentných látok je nízka, čo je výsledkom viacerých faktorov. Bakteriálna mikroflóra zohráva kľúčovú úlohu v metabolizme zlúčenín pokračujúcich do hrubého čreva. Dochádza k štiepeniu kruhu bakteriálnymi enzýmami na γ -valerolaktóny až fenolické kyseliny. Rozkladné produkty sa môžu ľahšie vstrebávať. Následne sú takisto konjugované a vylučované renálne. S rastúcim polymeračným stupňom klesá absorpcia. Zároveň stúpa odolnosť voči mikrobiálnemu rozkladu. K depolymerizácii proantokyanidínov na vstrebateľné monoméry pravdepodobne nedochádza.

Pozitívnymi účinkami flavanolov na zdravie človeka sa aj v súčasnosti zaoberajú mnohé výskumné skupiny. Spracované údaje by sa dali využiť ako podklad pre ďalšie skúmanie.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Dominika Sobolová

Supervisor: Assoc. Prof. Přemysl Mladěnka, Pharm.D., Ph.D.

Title of diploma thesis: Pharmacokinetics of flavanols

This work is focusing on summarizing available information about the fate of flavanols in the organism. It is necessary to know the pharmacokinetics to explain their biological effects. In contrast to other flavonoids, they occur in the form of aglycones in plant foods. Galoylation, polymerization and optical isomerism have an important influence on the pharmacokinetics. Partial absorption of monomers begins in the small intestine after oral ingestion. In addition to the liver, the extensive metabolic changes take place even in the enterocytes. The resulting metabolites enter the circulation or they are effluxed back into the intestinal lumen, especially in the case of (epi)catechin sulfates. Epicatechin and catechin are present almost exclusively as glucuronides, sulfates or methylated compounds in the plasma. On the contrary, free unconjugated forms prevail within the gallates. The extent of their absorption is lower. They are excreted via biliary excretion, while other catechins are quickly eliminated by the kidneys in urine. The bioavailability of the parent substances is low due to many factors. Intestinal bacteria play a key role in metabolism of compounds that pass to the large intestine. The cleavage of the ring to γ -valerolactones and other phenolic compounds by bacterial enzymes occurs there. The ring-fission metabolites could be more easily absorbed. Then they are also conjugated and excreted urinary. The absorption decreases with increasing degree of polymerization. The resistance against bacterial breakdown increases simultaneously. There is probably no depolymerization of proanthocyanidins to flavanol monomers that could be available for absorption.

Nowadays, many research groups are focused on positive effects of flavanols on human health. These compiled data could be used as a basis of the following research.

Obsah

1	Zoznam skratiek	8
2	Úvod a cieľ	9
3	Obecná charakteristika flavanolov	10
3.1	Zaradenie skupiny a fyziologický význam	10
3.2	Chemická štruktúra a rozdelenie	10
3.3	Výskyt a potravinové zdroje	16
3.4	Biosyntéza	18
3.5	Účinky na organizmus.....	20
4	Absorpcia.....	22
4.1	Miesto a rozsah absorpcie	23
4.2	Vybrané faktory ovplyvňujúce absorpciu a biodostupnosť	28
5	Distribúcia	33
6	Metabolizmus	36
6.1	Metabolizmus v tenkom čreve a v pečeni	36
6.2	Metabolizmus v hrubom čreve, úloha bakteriálnej mikroflóry.....	38
7	Exkrécia.....	41
8	Podrobnejšie údaje o vybraných predstaviteľoch.....	43
8.1	Epikatechín.....	43
8.1.1	Rôzne spôsoby skúmania absorpcie	44
8.1.2	Efflux limitujúci absorpciu	45
8.1.3	Metabolity epikatechínu detekované v plazme u človeka	46
8.1.4	Metabolity epikatechínu detekované v moči u človeka.....	50
8.1.5	Medzidruhové rozdiely v metabolizme	51
8.2	Katechín	54
8.3	Galáty	55
8.4	(Epi)galokatechíny	58

8.5	Proantokyanidíny.....	58
8.5.1	Absorpcia a metabolizmus natívnych foriem.....	58
8.5.2	Depolymerizácia na monoméry	59
8.5.3	Bakteriálny rozklad na fenolické kyseliny	61
8.6	Teaflavíny a tearubigíny.....	64
9	Diskusia.....	65
10	Záver.....	69
	Zoznam obrázkov.....	70
	Zoznam tabuliek.....	72
	Použitá literatúra	73

1 Zoznam skratiek

AUC	„area under the curve“, plocha pod krivkou
C_{max}	maximálna plazmatická koncentrácia
COMT	katechol- <i>O</i> -metyltransferáza
hCMEC/D3	„human cerebral microvessel endothelial cell line“, ľudské kapilárne mozgové endotelové bunky
HEB	hematoencefalická bariéra
HPLC	„high-performance liquid chromatography“, vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
MCT	monokarboxylátový transportér
MK-571	inhibítor transportérov MRP
MRP 1	„multidrug resistance-associated protein 1“
MRP 2	„multidrug resistance-associated protein 2“
MS	„mass spectrometry“, hmotnostná spektrometria
PA	proantokyanidíny
P_{app}	koeficient zdanlivej permeability
PB1	prokyanidín B1, epikatechín-(4 β →8)-katechín
PB2	prokyanidín B2, epikatechín-(4 β →8)-epikatechín
PB3	prokyanidín B3, katechín-(4 α →8)-katechín
PB4	prokyanidín B4, katechín-(4 α →8)-epikatechín
PB5	prokyanidín B5, epikatechín-(4 β →6)-epikatechín
PC2	prokyanidín C2, katechín-(4 α →8)-katechín-(4 α →8)-katechín
RFMs	„ring fission metabolites“, metabolity s rozštiepeným kruhom
5C-RFMs	„5 carbon side chain ring fission metabolites“, metabolity s rozštiepeným kruhom, s vedľajším reťazcom z 5 uhlíkov
3/1C-RFMs	„3 to 1 carbon side chain ring fission metabolites“, metabolity s rozštiepeným kruhom, s vedľajším reťazcom z 3 až 1 uhlíka
SREM	„structurally related epicatechin metabolites“, metabolity štruktúrne príbuzné epikatechínu
SULT	sulfotransferáza
t_{max}	čas, za ktorý je dosiahnutá C_{max}
$t_{1/2}$	plazmatický polčas
UGT	uridín-5'-difosfátglukuronyltransferáza

2 Úvod a cieľ

Flavanoly patria medzi významné bioaktívne zlúčeniny. Ich absorpcia, distribúcia, metabolizmus a exkrécia sú neustále predmetom záujmu mnohých výskumov v posledných rokoch. Získané údaje sa využívajú napríklad pri skúmaní mechanizmu účinku, ktorý nie je podrobne objasnený. Ďalej sú dôležité pri hodnotení bezpečnosti a rizík, či pri odhalení prípadných interakcií. Veľký význam majú ale hlavne pri hľadaní súvislostí medzi príjmom zlúčenín a ich pôsobením na zdravie, či už vo forme rastlinnej potravy, nápojov, ale aj rôznych potravinových doplnkov.

Pre porozumenie procesov prebiehajúcich po podaní do organizmu je potrebné mať dostatok dát. Cieľom tejto práce je v nasledujúcom texte spracovať a zhrnúť dostupné informácie týkajúce sa farmakokinetiky flavanolov. Poznatky vychádzajú hlavne zo štúdií na ľuďoch *in vivo*, za súčasného porovnania medzidruhových rozdielov. Významné sú aj údaje z *in vitro*, prípadne *in situ* výskumov, pretože pomôžu objasniť mnoho súvislostí. Kapitoly sa zameriavajú najskôr na všeobecnejšie informácie o celej skupine. Následne podrobnejšie rozoberajú vybraných zástupcov, ktorí sa najviac vyskytujú v rastlinách a v bežnej strave. Základom pre pochopenie procesov je obecná charakteristika skupiny, vrátane zaradenia, štruktúrnych znakov, výskytu či biosyntézy, čomu sa venuje začiatok práce.

3 Obecná charakteristika flavanolov

3.1 Zaradenie skupiny a fyziologický význam

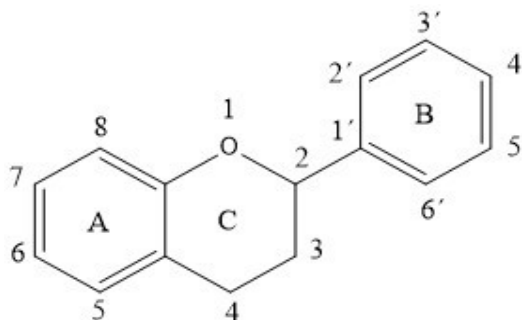
Fenolické zlúčeniny sa delia na flavonoidy a neflavonoidné látky. Medzi flavonoidy, patriace k polyfenolom, radíme podľa chemickej štruktúry ďalších niekoľko skupín (Crozier et al. 2006a).

Polyfenolické látky boli, a stále sú, predmetom intenzívneho záujmu mnohých výskumov. Ide o rozšírenú skupinu sekundárnych metabolitov rastlín, o čom svedčí aj počet identifikovaných štruktúr. Udáva sa až niekoľko tisíc (Manach et al. 2004). Tvoria ich významnú súčasť, pretože sú potrebné k dôležitým fyziologickým procesom. Medzi najvýznamnejšie úlohy patrí podiel na raste a reprodukciu, morfolologickej stavbe, sú zodpovedné za sfarbenie rôznych druhov rastlín. Ďalej sa podieľajú na ochrane pred UV žiarením, pred napadnutím patogénnymi mikroorganizmami a predátormi (Bravo 1998, Manach et al. 2004).

3.2 Chemická štruktúra a rozdelenie

Polyfenolické zlúčeniny sú charakterizované prítomnosťou dvoch alebo viacerých benzénových kruhov, z ktorých každý nesie najmenej jednu hydroxylovú skupinu (Clifford 2001). Vyskytujú sa v rôznych formách, od jednoduchších monomérnych zlúčenín, cez oligomérne, až po polymérne látky (Bravo 1998).

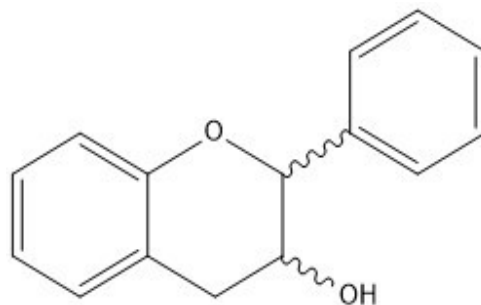
Základný skelet flavonoidov pozostáva celkovo z 15 uhlíkov (Obr. 1). Spojenie medzi benzénovými kruhmi, označovanými ako A a B, tvorí reťazec obsahujúci tri atómy uhlíka. Tieto kruhy uzatvárajú tretí šesťčlenný kyslíkatý heterocyklus, kruh C (Beecher 2003, Merken a Beecher 2000).



Obr. 1 Základná štruktúra flavonoidov s číslovaním
Vytvorené podľa: Bravo 1998

Na základe obmien základnej štruktúry sa flavonoidy rozdeľujú. Podľa polohy pripojenia kruhu B ku kruhu C (pripojenie aromatického kruhu na benzopyrán) sa delia na: flavonoidy, izoflavonoidy a neoflavonoidy (Marais et al. 2006). Ďalšie rozdelenie je podľa oxidačného stavu a nasýtenia kruhu C (podľa typu heterocyklu): flavanoly, flavóny, izoflavóny, flavanóny, antokyanidíny, flavonoly (Beecher 2003, Manach et al. 2004). Takmer v každej rastline nájdeme niektoré z vymenovaných hlavných šiestich skupín, v rámci ktorých sa ešte jednotlivé zlúčeniny líšia hydroxyláciou a konjugáciou. Ostatné skupiny sa vyskytujú v potravinách len zriedkavo (Beecher 2003, Crozier et al. 2009). Sú to napríklad chalkóny a izochalkóny, vyznačujúce sa otvoreným kruhom C (Del Rio et al. 2013).

Táto práca je zameraná konkrétne na flavanoly. Ich základ tvorí vyššie popísaná difenylpropánová štruktúra, nazývaná aj flavanové jadro (Marais et al. 2006). Charakteristickým znakom flavonoidov je pripojenie kruhu B na kruh C v pozícii 2. U flavanolov je C kruh nasýtený. Nevyhnutnú funkčnú skupinu v polohe 3 predstavuje voľná hydroxylová skupina, prípadne esterifikovaná kyselinou galovou (Beecher 2003). Presnejší názov flavanolov, práve podľa lokalizácie hydroxyly, je flavan-3-oly (Obr. 2). Ďalej bude v texte používané označenie flavanoly.

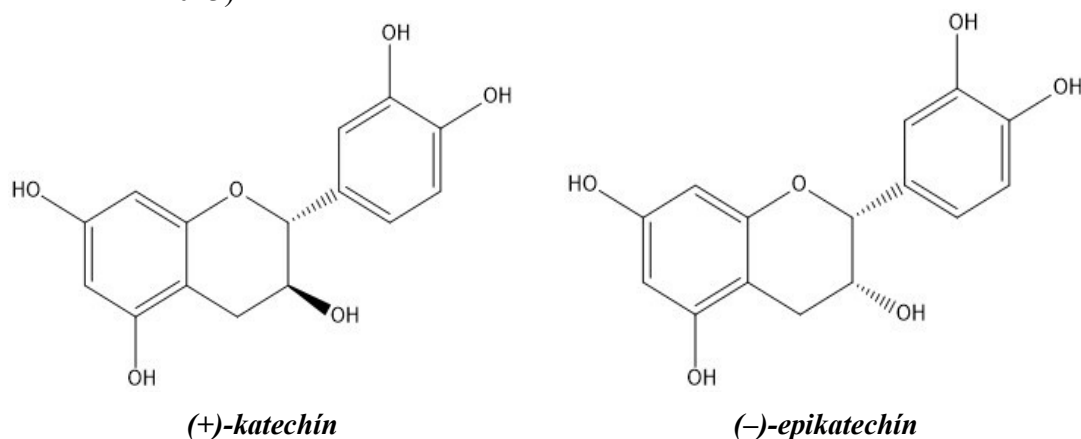


Obr. 2 Štruktúra flavan-3-ol
Štruktúra vytvorená podľa: Del Rio et al. 2013

V rastlinách sa bežne nevyskytujú ako glykozidy, na rozdiel od väčšiny flavonoidov. Stretávame sa s nimi vo forme aglykónov. To, či obsahujú zlúčeniny naviazaný sacharid, najčastejšie glukózu, môže ovplyvniť aj ich vlastnosti. Predovšetkým sa zvyšuje rozpustnosť vo vode, čo vo veľkej miere vplýva na kinetiku v organizme (Crozier et al. 2009, Hollman 2004).

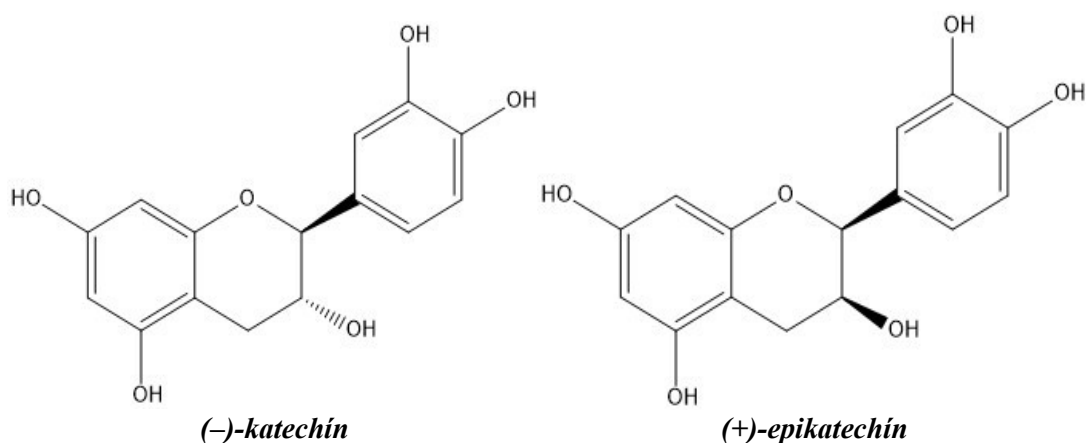
Čo sa týka stereoizomérie, sú to látky opticky aktívne. Flavanoly obsahujú 2 chirálne centrá na uhlíkoch C2 a C3, polymérne proantokyanidíny (viď ďalej) ďalšie na C4 (Clifford 1986).

Medzi monoméry s voľnou hydroxylovou skupinou patria v prírode najrozšírenejšie látky: (+)-katechín /(*2R,3S*)/ a (-)-epikatechín /(*2R,3R*)/, viď Obr. 3 (Crozier et al. 2009, Del Rio et al. 2013).



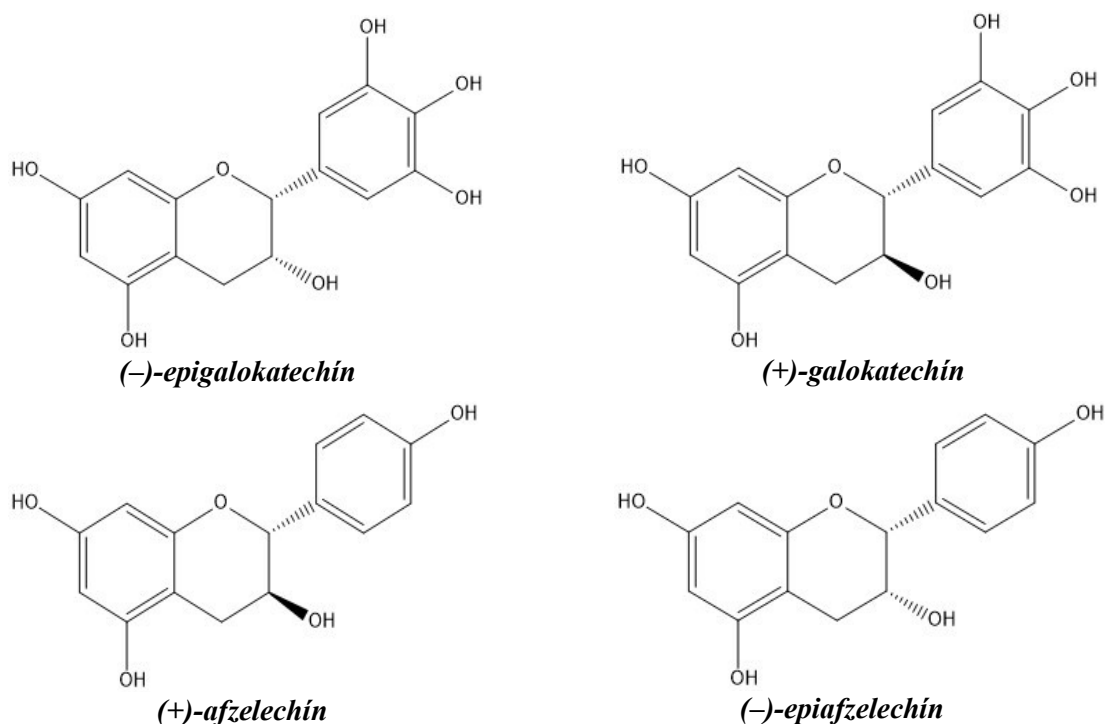
Obr. 3 (+)-katechín a (-)-epikatechín
Štruktúry vytvorené podľa: Del Rio et al. 2013

Naopak (-)-katechín /(*2S,3R*)/ a (+)-epikatechín /(*2S,3S*)/ sa vyskytujú len veľmi zriedka (Clifford 1986), viď Obr. 4.



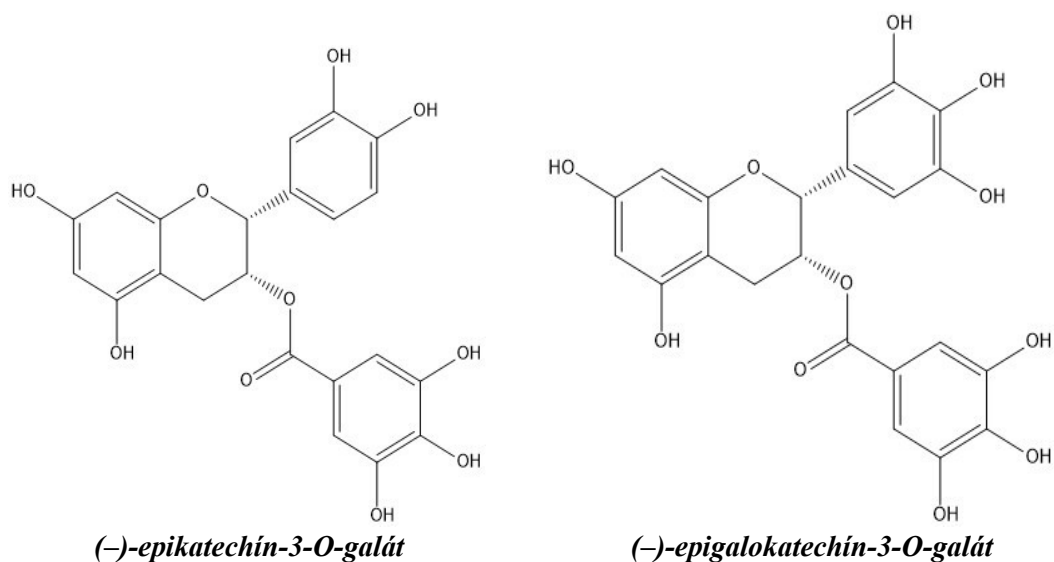
Obr. 4 (-)-katechín a (+)-epikatechín
Štruktúry vytvorené podľa: Del Rio et al. 2013

Ďalšou hydroxyláciou kruhu B vznikajú galokatechíny: (-)-epigalokatechín /(*2R,3R*)/ a (+)-galokatechín /(*2R,3S*)/. Dehydroxylované sú (+)-afzelechín /(*2R,3S*)/ a (-)-epiafzelechín /(*2R,3R*)/ (Crozier et al. 2009, Del Rio et al. 2013). Štruktúry viď Obr. 5.



Obr. 5 (-)-epigalokatechín, (+)-galokatechín, (+)-afzelechín a (-)-epiafzelechín
Štruktúry vytvorené podľa: Del Rio et al. 2013

Prípadne sú prítomné zlúčeniny s hydroxylom esterifikovaným kyselinou galovou, galáty. Medzi najrozšírenejšie patria (-)-epikatechín-3-O-galát /2*R*,3*R*/ a (-)-epigalokatechín-3-O-galát /2*R*,3*R*/ (Crozier et al. 2009, Del Rio et al. 2013) na Obr. 6.



Obr. 6 (-)-epikatechín-3-O-galát a (-)-epigalokatechín-3-O-galát
Štruktúry vytvorené podľa: Del Rio et al. 2013

Uvedení predstaviteľia sú najvýznamnejší a objasnenie ich farmakokinetiky je dôležité. Minoritne sa vyskytujú aj odlišné látky. Tým sa práca venovať nebude.

Okrem monomérnych foriem flavanolov sa stretávame aj s dimérnymi až polymérnymi zlúčeninami, označovanými ako proantokyanidíny (ďalej PA), alebo kondenzované taníny (Manach et al. 2004). V starších štúdiách boli popísané väčšinou oligomérne formy. Skutočný polymeračný stupeň je veľmi variabilný. Nie vždy sa ho podarí presne určiť, z dôvodu zložitosti analýzy vysoko polymérnych zlúčenín a rozmanitosti štruktúr. V dnešnej dobe je to vďaka pokroku metód o niečo jednoduchšie a podarilo sa mnohé objasniť (Bravo 1998, Santos-Buelga a Scalbert 2000). Udáva sa, že PA môžu byť zložené až z 50 monomérnych jednotiek (Crozier et al. 2006a).

V literatúre sa stretávame s rozdelením na základe druhu monomérnych jednotiek. PA zložené výlučne z (epi)katechínu sa nazývajú prokyanidíny. Prodelfinidíny skladajúce sa z jednotiek (epi)galokatechínu a propelargonidíny z (epi)afzelechínov sú menej bežné (Crozier et al. 2006a). Na základe delenia podľa hydroxylácie A kruhu do dvoch skupín, obsahujúce floroglucinol a resorcinol, existujú aj ďalšie vzácne sa vyskytujúce skupiny. Najrozšírenejšie zastúpenie a význam v prírode, aj v rastlinnej potrave, majú jednoznačne prokyanidíny (Aron a Kennedy 2008). Preto je dôležité objasniť práve túto skupinu. Predstavitel'ov vyskytujúcich sa v práci aj s ich skratkami zhrňuje Tab. 1.

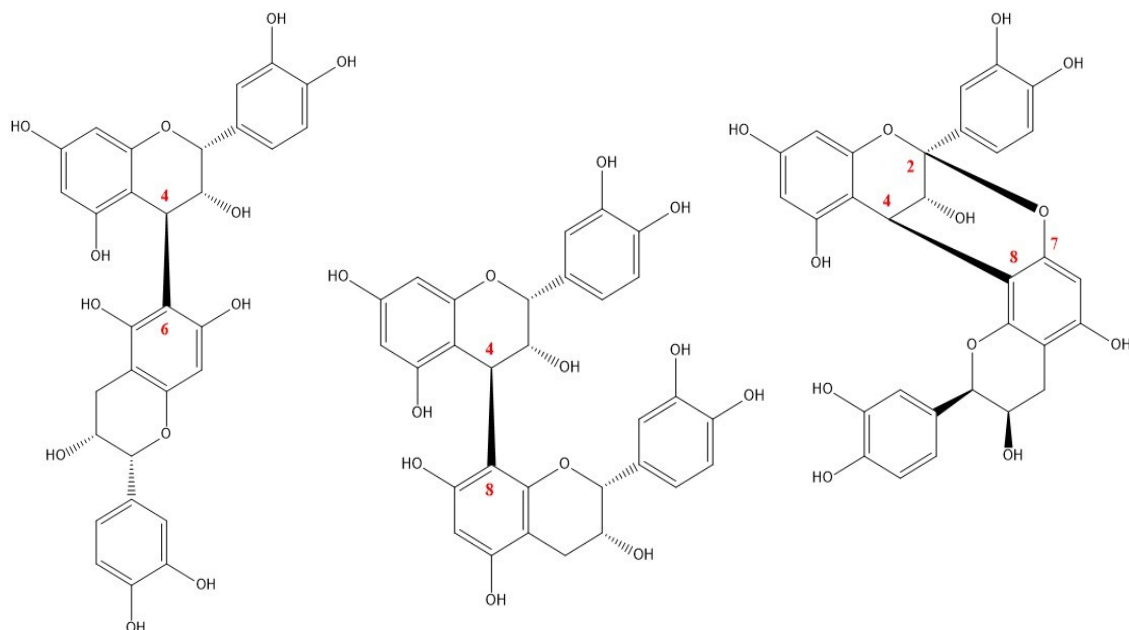
Tab. 1 Vybrané prokyanidíny typu A, B a C

Typ prokyanidínu	Štruktúra	Skratka
B1	(-)-epikatechín-(4 β →8)-(+)-katechín	PB1
B2	(-)-epikatechín-(4 β →8)-(-)-epikatechín	PB2
B3	(+)-katechín-(4 α →8)-(+)-katechín	PB3
B4	(+)-katechín-(4 α →8)-(-)-epikatechín	PB4
B5	(-)-epikatechín-(4 β →6)-(-)-epikatechín	PB5
C2	(+)-katechín-(4 α →8)-(+)-katechín-(4 α →8)-(+)-katechín	PC2
A1	(-)-epikatechín-(2 β →O-7,4 β →8)-(+)-katechín	PA1
A2	(-)-epikatechín-(2 β →O-7,4 β →8)-(-)-epikatechín	PA2

*Konfigurácia na uhľiku C4 alebo C2 je vyznačená ako α alebo β ; → vyznačuje smer väzby.
Spracované do tabuľky podľa: Aron a Kennedy 2008*

Jednotlivé typy sa rozdeľujú podľa polohy pripojenia a počtu monomérov. Najbežnejší typ B vzniká spojením C4 „hornej“ alebo „rozširujúcej jednotky“, a C8 (typy B1 – B4) alebo C6 (typy B5 – B8) „spodnej jednotky“. Typ A vytvára navyše éterovú väzbu medzi

uhlíkmi C2 a C7, menej C2 a C5 (Aron a Kennedy 2008, Crozier et al. 2006a, Santos-Buelga a Scalbert 2000). Príklady vybraných štruktúr sú uvedené na Obr. 7.

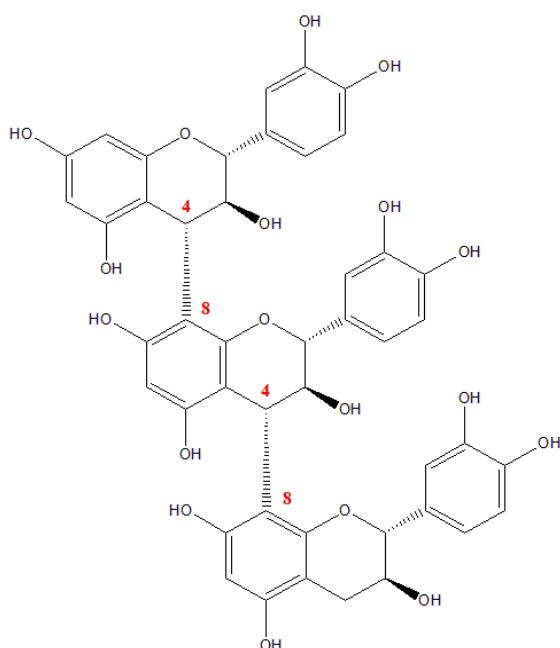


Obr. 7 Štruktúry vybraných zástupcov proantokyanidínov

Zľava: prokyanidín B5, prokyanidín B2, prokyanidín A2. Červené čísla označujú polohu pripojenia jednotiek.

Štruktúry vytvorené podľa: Crozier et al. 2006a

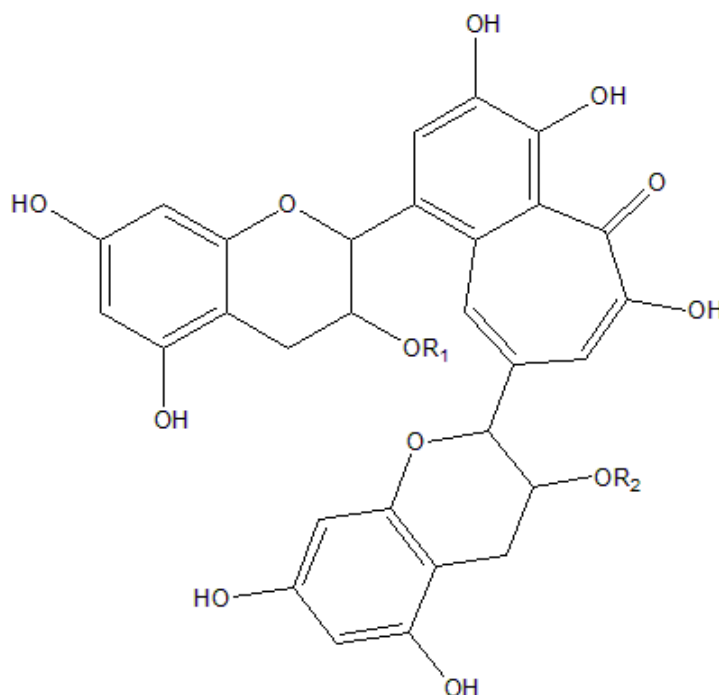
Triméry so spojením jednotiek C4 a C8 tvoria typ C (Aron a Kennedy 2008, Crozier et al. 2006a, Santos-Buelga a Scalbert 2000). Na Obr. 8 je znázornený prokyanidín C2.



Obr. 8 Prokyanidín C2

Štruktúra vytvorená podľa: Santos-Buelga a Scalbert 2000

Štruktúra flavanolov sa môže meniť pri spracovaní rastlín. Príkladom sú kondenzačné produkty: teaflavíny (Obr. 9) a ich polyméry tearubigíny. Ich obsah sa zvyšuje v priebehu fermentácie zelených listov, pri príprave oolong a čierneho čaju (Del Rio et al. 2004). Radia sa tiež medzi tzv. „tannin-like“ (trieslovinám podobné) zlúčeniny (Santos-Buelga a Scalbert 2000).



Obr. 9 Obecná štruktúra teaflavínov

Konkrétne predstavitelia: teaflavín, $R_1=R_2=H$; teaflavín-3-galát, $R_1=galát$, $R_2=H$; teaflavín-3'-galát, $R_1=H$, $R_2=galát$; teaflavín-3,3'-digalát, $R_1=R_2=galát$.
Prevzaté a upravené podľa: Beecher 2003

3.3 Výskyt a potravinové zdroje

Flavanoly sa nachádzajú v mnohých častiach rastlín: v plodoch, v listoch, v kôre, či v semenách (Dixon et al. 2005). Bežne sa vyskytujú v potrave rastlinného pôvodu, nielen v ovocí a zelenine, ale sú aj súčasťou nápojov, potravinových doplnkov a iných produktov (Aron a Kennedy 2008). Zastúpenie a koncentrácie jednotlivých predstaviteľov sa v prírodných zdrojoch značne líšia, čo je stručne uvedené ďalej.

Najbohatším zdrojom monomérov sú zelený čaj a čokoláda. Avšak máme doklady o rozdieloch aj medzi týmito zástupcami. (Epi)katechíny sú hlavné flavanoly ovocia. Vysoký obsah katechínu majú napríklad marhule, bôb, hrozno, jahody. Na rozdiel

od epikatechínu, ktorý sa vyskytuje vo veľkej miere v jablkách, v černiciach, v hrozne, v čerešniach, v hruškách či v malinách. Galáty a (epi)galokatechíny sa naopak nachádzajú takmer výlučne v zelenom čaji, menej v hrozne či v strukovinách (Manach et al. 2004, Williamson a Manach 2005).

PA bežne konzumujeme v kakau, víne, jablkách (Williamson a Manach 2005). Rozmanitosť výskytu je viditeľná v Tab. 2 na zástupcoch typu B1 – B4, ktoré sú najlepšie preskúmané (Haslam 1977).

Tab. 2 Prírodné zdroje proantokyanidínov typu B

Typ proantokyanidínu B	Zdroj
B1	hrozno, cirok, brusnice
B2	jablká, kakaové bôby, čerešne
B3	jahody, chmeľ
B4	maliny, černice

Prepracované z textu do tabuľky podľa: Haslam 1977

Najvýznamnejšie potravinové zdroje vyskytujúce sa aj v štúdiách sú: zelený a čierny čaj, víno a čokoláda (Manach et al. 2004).

Čaj

Čaje delíme na tri základné skupiny, líšiac sa chemickým zložením, procesom spracovania a samozrejme chuťou či vôňou: zelený, čierny a oolong čaj (Crozier et al. 2006b). V jednej z mnohých publikácií sa potvrdilo, že zelený čaj (*Camellia sinensis*) obsahuje vysoké množstvo monomérov, hlavne (–)-epigalokatechín, (–)-epikatechín, (–)-epigalokatechíngalát a (–)-epikatechíngalát (Del Rio et al. 2004). Vo vode rozpustné čajové katechíny dodávajú zelenému čaju trpkosť, ktorá sa s degaloyláciou znižuje. Ovpływujú tiež typické sfarbenie a vôňu (Wang et al. 2000). V čiernom čaji sa mení zastúpenie zlúčenín. Klesá obsah monomérov, kvôli vzájomnému spájaniu. Zároveň teda stúpa koncentrácia kondenzačných produktov, ktoré zelený čaj neobsahuje: teaflavín, teaflavín-3-*O*-galát, teaflavín-3'-*O*-galát, a teaflavín-3,3'-*O*-digalát, prípadne polymerizujú. Vysvetlenie tohto procesu je preskúmané. Čerstvé listy sú bohaté na katechíny. Okrem toho obsahujú v oddelených kompartmentoch oxidačné enzýmy, ktoré sa pri spracovaní dostávajú do kontaktu s flavanolmi. Je to spôsobené tým, že pri zvinovaní dochádza k narušeniu bunkovej štruktúry. Vznikajú diméry až polyméry s typickým sfarbením (oranžové, hnedé). Pri výrobe dochádza vo veľkej miere

k oxidačným procesom. Čierny čaj je úplne oxidovaný a oolong len čiastočne (Del Rio et al. 2004, Song a Chun 2008, Wang et al. 2000). Hlavným enzýmom tohto oxidačného procesu je polyfenoloxidáza. Jej primárnymi substrátmi sú monoméry flavanolov (Drynan et al. 2010). Pri výrobe zeleného čaju sa mladé listy po zozbieraní tepelne spracovávajú (sparenie horúcou vodou), čím sa zabráni oxidácii, označovanej ako fermentácia (Wang et al. 2000).

Víno

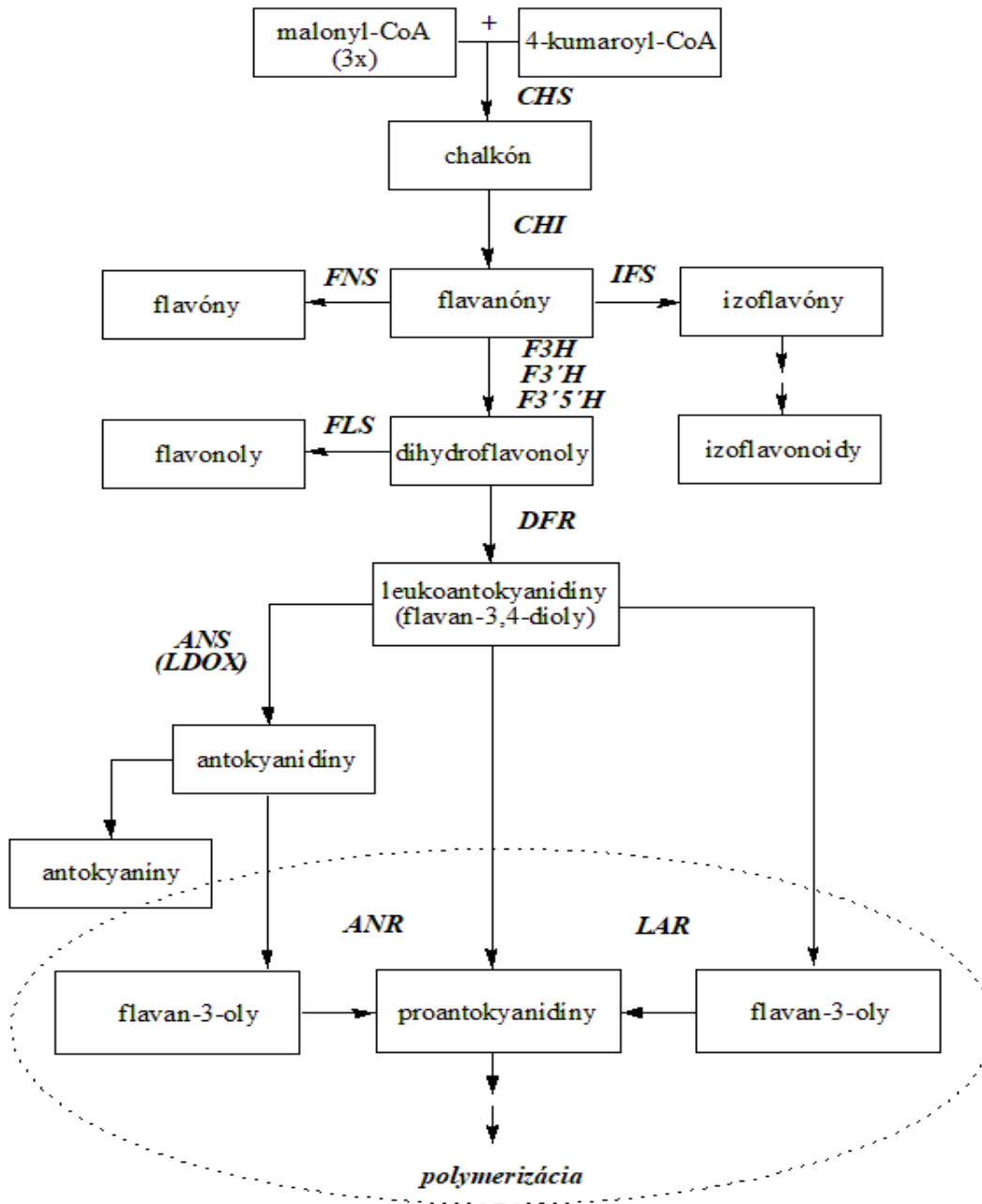
V červenom víne nachádzame PA, hlavne oligoméne prokyanidíny, prípadne prodelfinidíny. Hladiny monomérov sú nižšie (Crozier et al. 2006b). Získavajú sa z jadriek a zo šupiek viniča (*Vitis vinifera*) počas fermentácie. Obsah závisí na konkrétnej odrode a na procese spracovania. Červené víno sa vyrába fermentáciou bobúľ spolu so šupkami a jadierkami, lisuje sa až potom. Vďaka tomu červené víno obsahuje oveľa vyššie množstvo flavanolov. Zatiaľ čo pri výrobe bieleho vína, dochádza k lisovaniu pred fermentáciou. Až následne sa získaná hroznová šťava necháva kvasiť (Waterhouse 2002). V štúdiách sa používa často extrakt z hroznových jadriek.

Kakao a čokoláda

Kakaové bôby sa získavajú z kakaovníka (*Theobroma cacao*). Po fermentácii a sušení sa pražia. Po ďalších úpravách sa vytvorí kakaová hmota, z ktorej sa lisuje kakaové maslo. Po pridaní ostatných prísad sa vyrába čokoláda a zbytok sušiny je rozomletý na kakaový prášok. Ten je určený pre prípravu kakaových nápojov. Hlavnými polyfenolickými zlúčeninami týchto potravín sú práve flavanoly. Prevažujú (-)-epikatechín a (+)-katechín. Sú tiež bohatým zdrojom PA, hlavne PB2, PB5 a PC1. Ich prítomnosť bola preukázaná vo viacerých výskumoch uskutočňovaných práve na flavanoloch kakaa, bohatého na tieto zlúčeniny (Crozier et al. 2006b).

3.4 Biosyntéza

Biosyntéza flavanolov v rastlinách vychádza z obecnej biosyntetickej dráhy flavonoidov, dnes už pomerne dobre objasnenej. Vďaka pokroku v genetike sú z rastlín naklonované gény, štruktúrne aj regulačné, kódujúce enzýmy tejto dráhy (Holton a Cornish 1995, Winkel-Shirley 2002). Stručné schematické znázornenie biosyntetickej dráhy flavonoidov je uvedené na Obr. 10 s vyznačenou premenou na flavanoly a PA.



Obr. 10 Stručná schéma biosyntézy flavonoidov v rastlinách

Skratky enzýmov: ANR, antokyaniďínreduktáza; ANS, antokyaniďínsyntáza; DFR, dihydroflavonol-4-reduktáza; F3H: flavanón-3-hydroxyláza; F3'H, flavonoid-3'-hydroxyláza; F3'5', flavonoid-3'5'-hydroxyláza; FLS, flavonolsyntáza; FNS, flavónsyntáza; CHI, chalkónizomeráza; CHS, chalkónsyntáza; IFS, izoflavónsyntáza; LAR, leukoantokyaniďínreduktáza; LDOX, leukoantokyaniďíndeoxygenáza. Prerušovanou čiarou vyznačené premeny na flavanoly a proantokyaniďiny.

Spracované podľa: Crozier et al. 2006a, Winkel-Shirley 2002

Hlavnými prekuzormi sú malonylkoenzým A (malonyl-CoA) a 4-kumaroylkoenzým A (4-kumaroyl-CoA), pochádzajúce zo šikimátovej a acetátovej dráhy (Holton a Cornish 1995). Začiatok iniciuje enzým chalkónsyntáza a v prvom kroku vzniká chalkón. Je to

medziprodukt, z ktorého sa za pôsobenia viacerých enzýmov tvoria ďalšie skupiny flavonoidov. Prostredníctvom chalkónizomerázy vznikajú flavanóny. Nasledujú hydroxylačné procesy, výsledkom ktorých sú dihydroflavanoly. Jednotlivé enzymatické kroky sú katalyzované enzýmami: flavanón-3-hydroxyláza, flavonoid-3'-hydroxyláza, flavonoid-3',5'-hydroxyláza. Nasleduje enzým dihydroflavonol-4-reduktáza a vytvárajú sa flavan-3,4-dioly (leukoantokyanidíny). Tie sú premenené primárne na antokyanidíny pomocou antokyanidínsyntázy. Vedľajšou odbočkou je premena na flavan-3-oly a ich polymerizácia na PA (Schijlen et al. 2004).

Sú popísané dva rôzne spôsoby vzniku katechínov. Prvým je NADPH-dependentná redukcia C4 hydroxylovej skupiny leukoantokyanidínov, prostredníctvom leukoantokyanidínreduktázy. Druhú možnosť predstavuje prevedenie na antokyanidíny, s následnou redukciou antokyanidínreduktázou. Vznikajú teda priamo alebo nepriamo z flavan-3,4-diolov (Tanner et al. 2003). Doteraz popísané procesy prebiehajú v cytoplazme a následné kroky polymerizačných reakcií vo vakuolách. Preto je nutný transport monomérov flavan-3-olu a flavan-3,4-diolu. Dôležité pre pochopenie týchto dejov je objasnenie transportných mechanizmov flavonoidov, ktoré na rozdiel od biosyntetickej dráhy obsahujú viacero nejasností (Petruša et al. 2013, Tanner et al. 2003). Po transporte je možná polymerizácia, ktorej produktami sú PA, prebiehajúca postupnými adičnými reakciami (Schijlen et al. 2004).

3.5 Účinky na organizmus

Pozitívne účinky stravy bohatej na zeleninu a ovocie, ako aj nápojov rastlinného pôvodu, sú obecné známe, primárne pre ich pôsobenie v prevencii mnohých chronických ochorení. To je predmetom rozsiahlych štúdií (Aron a Kennedy 2008, Hollman 2004). Pravidelná konzumácia ovocia a zeleniny je taktiež súčasťou doporučení pre prevenciu kardiovaskulárnych chorôb pre Českú republiku (Býma a Hradec 2013).

Flavonoidy, vyskytujúce sa v tejto potrave, sú považované za zlúčeniny s antioxidantnými a chelatačnými schopnosťami, interagujú ale tiež špecifickejšie s inými cieľmi (Heim et al. 2002, Mladěnka et al. 2010). Dnes sa objavuje stále viac dôkazov, že strava bohatá na flavanoly znižuje riziko vzniku kardiovaskulárnych a niektorých onkologických ochorení. Vychádza sa z pôvodných štúdií (Zhang et al. 2013). Účinky boli pozorované u dlhodobého prísunu látok potravou (Del Rio et al. 2013).

Flavanoly pôsobia predovšetkým antioxidačne, antimikróbne a protizápalovo. Pomáhajú znižovať hladiny cholesterolu, inhibujú oxidáciu LDL cholesterolu. Ďalej zvyšujú syntézu oxidu dusnatého (NO), podporou aktivácie endoteliálnej NO-syntázy, čím dochádza k inhibícii agregácie trombocytov. S tým súvisí aj obmedzenie doštičkovej aktivácie. Popísané boli aj účinky na úrovni mitochondrií. Výsledkom týchto viacerých mechanizmov je konečný kardioprotektívny efekt. Na antikancerogénnom účinku sa tiež pravdepodobne podieľa niekoľko mechanizmov, napríklad zachytávanie voľných radikálov, indukcia apoptózy, supresia onkogénov a ďalšie (Aron a Kennedy 2008, Barnett et al. 2015, Santos-Buelga a Scalbert 2000). Oligomérne a polymérne formy pravdepodobne pôsobia aj priamo v čreve (imunomodulačne, antioxidačne, tvorba komplexov s minerálmi), prípadne prostredníctvom mikrobiálnych metabolitov (Gonthier et al. 2003, Rios et al. 2002).

4 Absorpcia

Prvou fázou farmakokinetiky je absorpcia flavanolov z tráviaceho traktu do systémového obehu. V porovnaní s ostatnými skupinami, vyskytujúcimi sa vo forme glykozidov, nemusia byť ešte pred vstrebaním hydrolyticky rozštiepené. Absencia cukru znamená, že aglykóny sú lipofilnejšie a ľahšie prestupujú membránami. Významný vplyv majú okrem lipofility tiež molekulová hmotnosť a konfigurácia. Dôležité sú ďalej obmeny štruktúry: galoylácia a polymerizácia. V oboch vymenovaných prípadoch dochádza k zníženiu absorpcie (Crozier et al. 2006b, Gonthier et al. 2003, Hollman 2004).

Na základe výsledkov doterajších štúdií sa dokázalo, ako bolo zhrnuté aj vo viacerých revíziách článkoch, že dochádza k čiastočnej absorpcii flavanolov z tráviaceho traktu (Williamson a Manach 2005). V plazme sa objavujú v submikromolárnych koncentráciách, maximálne v jednotkách mikromolov (Auger et al. 2008).

Čiastočná absorpcia sa potvrdila v mnohých experimentálnych štúdiách s odlišnými potravinovými zdrojmi bohatými na flavanoly alebo samotnými čistými zlúčeninami. Ako príklad uvádzam niektoré z nich, dokazujúce vstrebávanie: (-)-epikatechínu z kakaa a tmavej čokolády (Actis-Goretta et al. 2012, Baba et al. 2000), (epi)katechínu a (epi)galokatechínu z extraktu zeleného čaju (Auger et al. 2008), monomérnych katechínov zo zeleného a čierneho čaju (Lee et al. 2002), (+)-katechínu z červeného vína (Donovan et al. 1999) a ďalšie. Vstrebávanie sa skúmalo u ileostomikov (Borges et al. 2013), aj po konzumácii u zdravých ľudí (Borges et al. 2010, Ottaviani et al. 2016). Podobná bola situácia po orálnom podaní u potkanov (Baba et al. 2001, Piskula a Terao 1998) a doplnujúce údaje sú dostupné zo skúmania na izolovaných orgánoch (Donovan et al. 2001, Spencer et al. 1999).

Z dôvodu rozsiahlej metabolizácie v enterocytoch, sprevádzajúcej absorpciu, sú flavanoly prítomné hlavne vo forme metabolitov. Existujú ale aj výnimky, ktoré budú spomenuté. Zlúčeniny v plazme sú väčšinou odlišné od tých, ktoré sú prítomné v potrave. Práve to je hlavnou príčinou nízkej biologickej dostupnosti parentných látok (Del Rio et al. 2013, Williamson a Manach 2005, Zhang et al. 2004). Dôvodom u PA je pravdepodobne ich zložitá štruktúra, vysoká molekulová hmotnosť alebo interakcie s proteínmi steny čreva. V starších štúdiách neboli brané do úvahy všetky metabolity flavanolov, čo bolo príčinou nepresného odhadu absorpcie (Del Rio et al. 2010).

In vitro štúdie absorpcie často využívajú spoľahlivý, aj keď z hľadiska fyziologického významu nie úplne presný model, a to monovrstvu ľudských črevných epitelových buniek Caco 2 (Vaidyanathan a Walle 2001, Vaidyanathan a Walle 2003, Zhang et al. 2004). Táto bunková línia je získaná z buniek kolorektálneho adenokarcinómu a vykazuje niektoré morfológické a funkčné charakteristiky enterocytov (Sambuy et al. 2005). Výhodou je možnosť odhadu permeability, ktorá je podobná ako *in vivo* u ľudí. Ďalej umožňuje štúdium transportných mechanizmov, presystémového metabolizmu v priebehu transportu črevným epitelom, effluxu či akumulácie v bunkách. Okrem toho sa študuje inhibičný vplyv niektorých zlúčenín na transportéry (Vaidyanathan a Walle 2001, Vaidyanathan a Walle 2003). Metóda má napriek jej užitočnosti viaceré limitácie, ktoré boli v literatúre popísané. Patria tu hlavne rozdiely v expresii enzýmov a transportérov, ktorá je nižšia oproti *in vivo* situácii (Sun et al. 2008).

Podrobný mechanizmus absorpcie je stále nejasný. Rozsiahle metabolické premeny vnútri enterocytov podporujú tvrdenia o prítomnosti intracelulárneho transportu, nie paracelulárneho (Donovan et al. 2001). U monomérnych katechínov pravdepodobne dochádza k pasívnej difúzii, čo ale nebolo úplne objasnené. Podporujú to fakty, že vo forme aglykónov sú flavanoly lipofilnejšie než glykozidy a absorpcia je úmerná podanej dávke (Crozier et al. 2006b).

4.1 Miesto a rozsah absorpcie

Flavanoly sú v žalúdku stabilné. Ich stabilita je preukázaná. Výnimkou nie sú ani oligomérne a polymérne formy (Auger et al. 2008, Borges et al. 2016, Rios et al. 2002). Do tenkého čreva sa dostávajú nezmenené, a tam je hlavné miesto absorpcie monomérov (Stalmach et al. 2010), aj na základe hodnôt t_{max} (čas, za ktorý je dosiahnutá maximálna plazmatická koncentrácia c_{max}). Pohybujú sa okolo 1 – 3 hodín (Crozier et al. 2006b).

Osud nevstrebávaných zlúčenín pokračujúcich do hrubého čreva sa stal až predmetom novších štúdií (Borges et al. 2016, Ottaviani et al. 2016). V hrubom čreve dochádza k vstrebávaniu metabolitov s rozštiepeným kruhom, čoho dôkazom je ich prítomnosť v telesných tekutinách a tkanivách, po orálnom podaní flavanolov (Borges et al. 2016). Zároveň sú snahy popísať úlohu bakteriálnej mikroflóry pri štiepení. V týchto prípadoch, kedy sa počíta aj s absorpciou rozkladných produktov, dochádza k výraznému zvýšeniu predpokladaného rozsahu. Dobre viditeľný je tento rozdiel po podaní flavanolov vo forme

zeleného čaju. Biologická dostupnosť čajových katechínov, vypočítaná ako pomer vylúčených zlúčenín k celkovému prijatému množstvu flavanolov, sa odhaduje na 4 – 8 %. Keď sa ale berú do úvahy aj rozkladné metabolity, pohybuje sa až okolo 40 – 60 % (Calani et al. 2012, Del Rio et al. 2010, Roowi et al. 2010). Vzhľadom na ich koncentrácie, vyššie ako u metabolitov s nedotknutým kruhom, by tieto fenolické zlúčeniny mohli mať potenciálne významný vplyv aj na aktivitu flavanolov v organizme.

Objavujú sa ale veľké individuálne rozdiely. U niektorých dobrovoľníkov dochádzalo až k 100 % absorpcii, na základe vylučovania celkových metabolitov v moči. Zatiaľ čo iní neboli schopní absorbovať v takej miere, hlavne rozkladné produkty. Rozsah v takýchto prípadoch klesol pod 30 % (Calani et al. 2012).

Štúdium absorpcie u ileostomikov

Štúdie u ileostomikov poskytujú údaje z inej perspektívy, hlavne za cieľom skúmania rozsahu absorpcie v tenkom čreve. Výsledky sa zároveň porovnávajú so štúdiami u zdravých dobrovoľníkov (Auger et al. 2008, Borges et al. 2013). V praxi to napríklad znamená, že podobné množstvo určitého metabolitu v moči u ileostomikov a zdravých ľudí, poukazuje na jeho absorpciu v tenkom čreve. Ak je prítomný iba v moči u človeka s funkčným hrubým črevom, predpokladá sa vstrebávanie tam. Prítomnosť zlúčenín v krvnom obehú a renálne vylučovanie, teda odrážajú vstrebávanie v tenkom čreve. Analýza ileálnej tekutiny informuje aj o metabolizme, effluxe, či o zlúčeninách prechádzajúcich do hrubého čreva (Borges et al. 2013, Del Rio et al. 2013, Stalmach et al. 2010).

Výtťažok flavanolov v ileálnej tekutine, vyjadrený ako percentuálny podiel z množstva prijatého potravou, sa líši. Po podaní 452 ± 3 μmol monomérov vo forme Polyfenonu E (dekofeínovaná zmes čajových katechínov), z toho až 69 % tvoril (–)-epigalokatechíngalát, bol približne 40 % (Auger et al. 2008). Podobný 43 % bol pozorovaný po vypití nápoja obsahujúceho polyfenoly zo zeleného čaju, jabĺk, hrozna a citrusov (Borges et al. 2013). K detekcii vyššieho 70 % výtťažku došlo po podaní zeleného čaju s obsahom 634 μmol flavanolov, z toho 38 % (–)-epigalokatechíngalát. Absorpcia flavanolov z tenkého čreva sa odhadovala na 30 % (Stalmach et al. 2010).

Vzniknuté až takmer 30 % rozdiely sa mohli objaviť z dôvodu použitia rôznych druhov nápojov. Ďalej bol identifikovaný odlišný počet a druh zlúčenín v jednotlivých štúdiách.

Na to mohol mať vplyv výber a citlivosť metódy analýzy. V jednom prípade sa objavili (-)-epikatechín, (-)-epigalokatechíngalát, (-)-epikatechíngalát a (+)-galokatechíngalát. Obsah ich metabolitov bol pod limitom kvantifikácie (Auger et al. 2008). V inej štúdiu boli identifikované rovnaké zlúčeniny a navyše (+)-galokatechín, (-)-epigalokatechín, (+)-katechín, ale zároveň aj ich metabolity (Stalmach et al. 2010).

Na základe zastúpenia flavanolov v ileálnej tekutine za 24 hodín môžeme získať informácie o rozdieloch medzi nimi. Čo sa týka nemetabolizovaných zlúčenín, výťažok stúpala v rade: (+)-katechín < (-)-epikatechín < (-)-epigalokatechín < (+)-galokatechín < (-)-epikatechíngalát < (-)-epigalokatechíngalát < (+)-galokatechíngalát (Stalmach et al. 2010), konkrétne množstvá vid' Tab. 3. Výsledky poukazujú na vyššiu absorpciu negaloylovaných zlúčenín. Galáty pravdepodobne vo väčšej miere pokračujú ďalej tráviacim traktom (Auger et al. 2008, Stalmach et al. 2010).

Tab. 3 Flavanoly v ileálnej tekutine za 24 hodín po konzumácii 300 ml zeleného čaju

Nemetabolizované zlúčeniny	Prijaté (μmol)	Ileálna tekutina (μmol)	% z prijatého množstva
(+)-katechín	18	1,2 ± 0,2	6,8 ± 1,2
(-)-epikatechín	69	7,9 ± 1,7	11 ± 2,5
(+)-galokatechín	50	13 ± 2,1	27 ± 4,2
(-)-epigalokatechín	190	35 ± 5,8	18 ± 3,1
(-)-epigalokatechín-3-O-galát	238	116 ± 5,1	49 ± 2,1
(+)-galokatechín-3-O-galát	5,2	4,6 ± 0,3	89 ± 5,2
(-)-epikatechín-3-O-galát	64	29 ± 3,3	45 ± 5,2
	634	207 ± 11	33 ± 1,8

Prevzaté a upravené podľa: Stalmach et al. 2010

Z metabolitov vylúčených späť do čreva tvorili najvyšší podiel sulfáty (epi)katechínov, až 72 ± 4,1 μmol z prijatých 87 μmol. Najmenší podiel bol u metabolitov galátov, len okolo 1 %, čo naznačuje pravdepodobne nižšiu črevnú metabolizáciu a efflux. Dôvodom by mohol byť aj menší prienik do buniek, s čím súhlasí vyššie zastúpenie nemetabolizovaných zlúčenín (Borges et al. 2013, Stalmach et al. 2010).

Nakoniec po sčítaní (epi)katechínov a ich metabolitov výťažnosť v ileálnej tekutine prekročovala 100 % (Borges et al. 2013, Stalmach et al. 2010). Tento vysoký obsah nebol objasnený. Niektorí sa prikláňali k názoru, že dochádza ku hydrolýze esterov pred absorpciou. Predpokladali orálne vstrebanie katechínov po zadržaní v ústach, následnú biotransformáciu slinnými žľazami a sekréciu späť do úst (Yang et al. 1999). Pôvod

enzýmov nebol jasne preukázaný. Nebol vylúčený ani mikrobiálny. Aktivita esteráz sa nenašla v krvi ani v pečeni u ľudí ani u potkanov (Crozier et al. 2006b).

Ďalej sa to pripisovalo esterázam v stene tenkého čreva schopným rozštiepiť galoylované zlúčeniny, napríklad epikatechín galát na epikatechín či epigalokatechín galát na epigalokatechín (Borges et al. 2013). Viaceré dôkazy však idú proti tomuto tvrdeniu. V moči po požití Polyfenonu E, ani samotného (–)-epigalokatechín galátu, sa nepodarilo identifikovať 3-*O*-galoylované metabolity, ani kyselinu 4-*O*-metyl galovú. To naznačuje neprítomnosť odštiepenia skupiny 3-*O*-galátu. Takisto neboli detekované v moči metabolity (–)-epigalokatechínu po konzumácii tobolky so 407 μmol (–)-epigalokatechín galátu (Auger et al. 2008). Aj v ďalšej práci sa zamietlo tvrdenie o prítomnosti esteráz. Nebolo by to prakticky možné, pretože testovací nápoj obsahoval až 64,6 μmol epigalokatechín galátu a len 6,3 μmol epikatechín galátu. Po odštiepení kyseliny galovej by sa v tomto prípade uvoľnilo viac epigalokatechínu ako epikatechínu. Výsledok bol však opačný (Borges et al. 2013).

Výsledky z plazmy a moču boli podobné ako u zdravých ľudí. U ileostomikov bol však nižší t_{max} (Tab. 4). Za príčinu sa považovala neprítomnosť tzv. ileálnej brzdy. U človeka s funkčným hrubým črevom je to v podstate spätný kontrolný mechanizmus, ktorý spomaľuje reflexne prechod distálnou časťou tenkého čreva. Stimulovaný je prijatou potravou. Keďže u ileostomikov chýba, mohli sa flavanoly skôr absorbovať. Hodnoty $t_{1/2}$ (plazmatický polčas) sa významne nelíšili (Stalmach et al. 2010, Van Citters a Lin 2006).

Tab. 4 Porovnanie časových parametrov vybraných metabolitov u zdravých dobrovoľníkov a u ileostomikov, po podaní zeleného čaju

Flavanol	t_{max}	t_{max}	$t_{1/2}$	$t_{1/2}$
	zdravých	ileostomikov	zdravých	ileostomikov
(epi)galokatechín- <i>O</i> -glukuronid	2,2 \pm 0,2	1,1 \pm 0,5	1,6	1,8
(epi)katechín- <i>O</i> -glukuronid	1,7 \pm 0,2	0,8 \pm 0,1	1,6	1,7
(epi)katechín- <i>O</i> -sulfát	1,6 \pm 0,2	1,3 \pm 0,3	1,9	1,5
(–)-epigalokatechín-3- <i>O</i> -galát	1,9 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1	1,0	1,9
(–)-epikatechín-3- <i>O</i> -galát	1,6 \pm 0,2	1,0 \pm 0,3	1,5	1,7

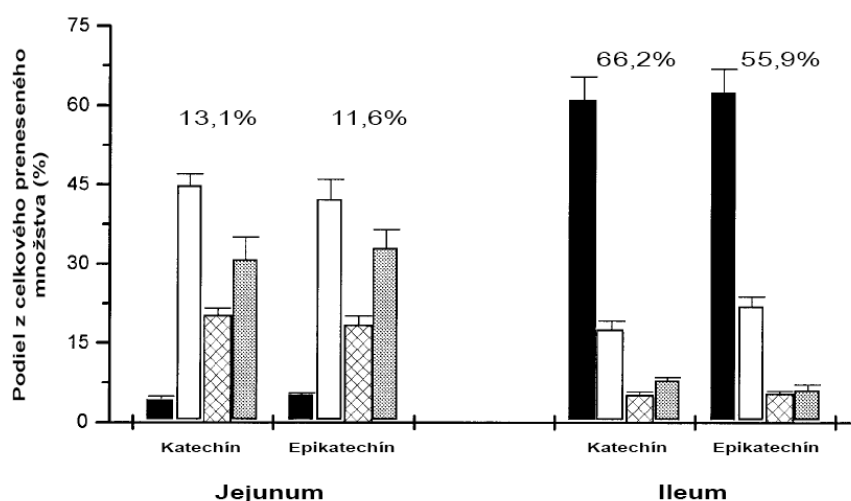
Hodnoty udávané v hodinách: t_{max} , čas dosiahnutia maximálnej plazmatickej koncentrácie; $t_{1/2}$, plazmatický polčas.

Prevzaté a upravené podľa: Stalmach et al. 2010

Štúdium absorpcie v tenkom čreve *in vitro* a *in situ* na potkanoch

Vstrebávanie flavanolov v tenkom čreve sa dokázalo aj v štúdiách na izolovaných preparátoch jejuna a ilea u potkanov (Kuhnle et al. 2000), a použitím *in situ* perfúzneho

modelu (Donovan et al. 2001). *In vitro* sa skúmal transport z črevného lumen na seróznú stranu po 90 minútach perfúzie epikatechínu a katechínu v koncentrácii 50 $\mu\text{mol/l}$. Tento model umožňoval aj sledovať metabolizmus v enterocytoch a identifikovať hlavné stenou transportované zlúčeniny HPLC (vysokoúčinná kvapalinová chromatografia) analýzou seróznej tekutiny. Rozsah prenosu v ileu bol asi 5-krát vyšší ako v jejunu. Cez jejunum prešlo minimálne množstvo nemetabolizovaných flavanoloov, cca 5 % z identifikovaných, ale oveľa viac metabolitov. Z nich okolo 45 % tvorili glukuronidy, 20 % *O*-metylované glukuronidy, 30 % 3'-*O*-metylované a 4'-*O*-metylované formy. V ileu naopak nemetabolizované flavanoly tvorili až približne 60 % a glukuronidy iba 20 %. Výsledné porovnanie absorpcie a metabolizmu je znázornené na Obr. 11 (Kuhnle et al. 2000).



Obr. 11 Kumulatívna absorpcia katechínu, epikatechínu a ich metabolitov za 90 min perfúzie cez izolované potkanie jejunum a ileum

Os y: percentuálny podiel z celkového preneseného množstva zlúčeniny v danej oblasti. Čísla nad krivkou x: percentuálny podiel prenesených zlúčenín z celkového perfuzovaného množstva za 90 min. Stĺpce zľava: transportované pôvodné zlúčeniny (čierny), glukuronidy (biely), *O*-metylované glukuronidy (šráfovaný), 3'-*O*-metylované a 4'-*O*-metylované formy (sivý).

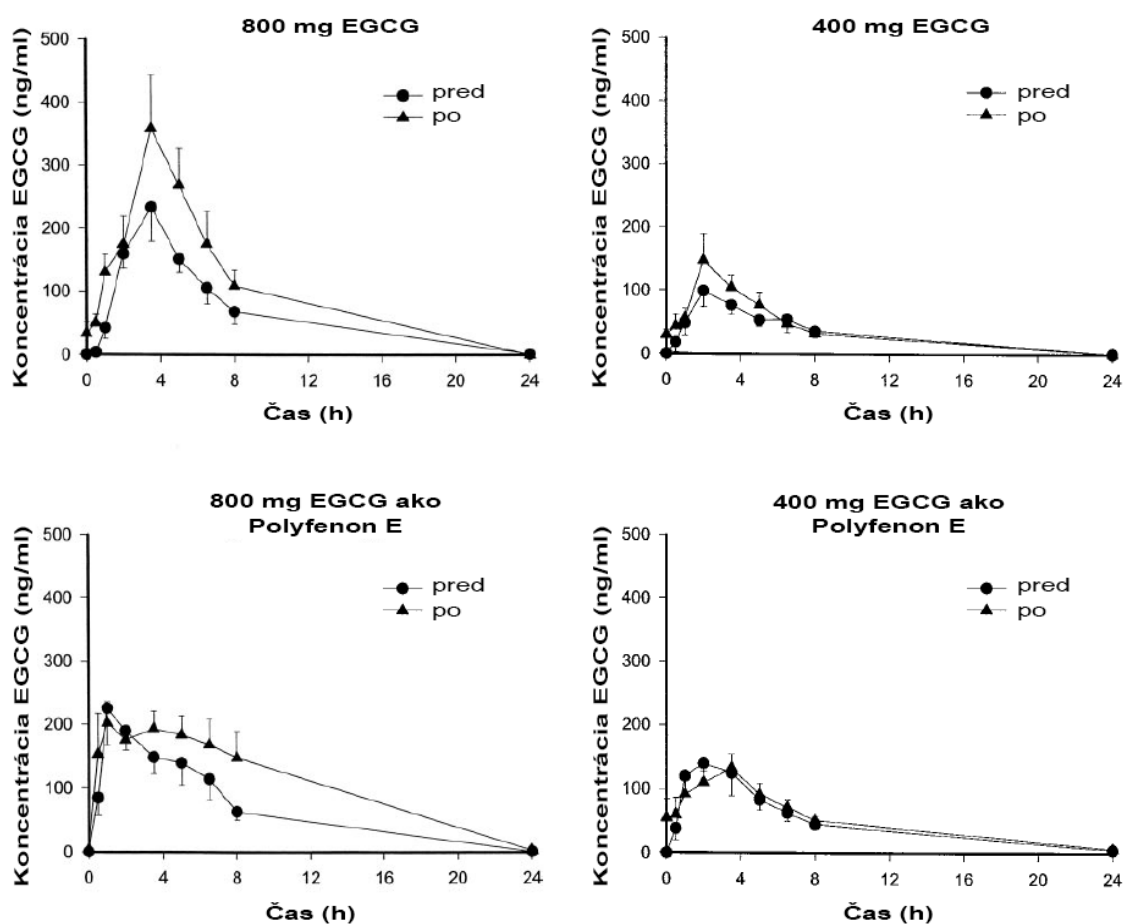
Prevzaté a upravené podľa: Kuhnle et al. 2000

In situ perfúzia jejuna a ilea má výhodu presnejšej charakterizácie, určenie množstva absorbovaných zlúčenín získaných z mezenterickej plazmy, a sledovanie ich osudu mimo čreva. Skúmaný nekonjugovaný katechín nebol, v koncentráciách od 1 do 100 $\mu\text{mol/l}$, v plazme detekovaný. V mezenterickej plazme boli detekované glukuronidy, aj 3'-*O*-metylované, rovnako ako v predchádzajúcom prípade. To značí o intestinálnom pôvode. Sulfatácia a ďalšia metylácia prebiehali pravdepodobne viac v pečeni, lebo metabolity boli detekované až v žlči a v aortálnej plazme. Absorbovalo sa 35 ± 2 % zlúčeniny (Donovan et al. 2001).

4.2 Vybrané faktory ovplyvňujúce absorpciu a biodostupnosť

Vplyv podanej dávky

Biodostupnosť flavanolov je priamo úmerná podanému množstvu (Barnett et al. 2015). Po podaní vyššej jednorazovej dávky dochádza k zvýšeniu AUC. Názornú ukážku predstavujú grafy na Obr. 12. Ako príklad som zvolila podávanie kapsúl epigalokatechíngalátu. 800 mg dávka odpoďadá AUC 96 ± 47 min. μ g/ml a 400 mg dávka AUC 47 ± 21 min. μ g/ml. Podobné výsledky sa dostavili aj po podaní rovnakých množstiev epigalokatechíngalátu vo forme Polyfenonu E (Chow et al. 2003). Po podaní 1200 mg Polyfenonu E sa potvrdilo opäť úmerné zvýšenie AUC (Chow et al. 2005).



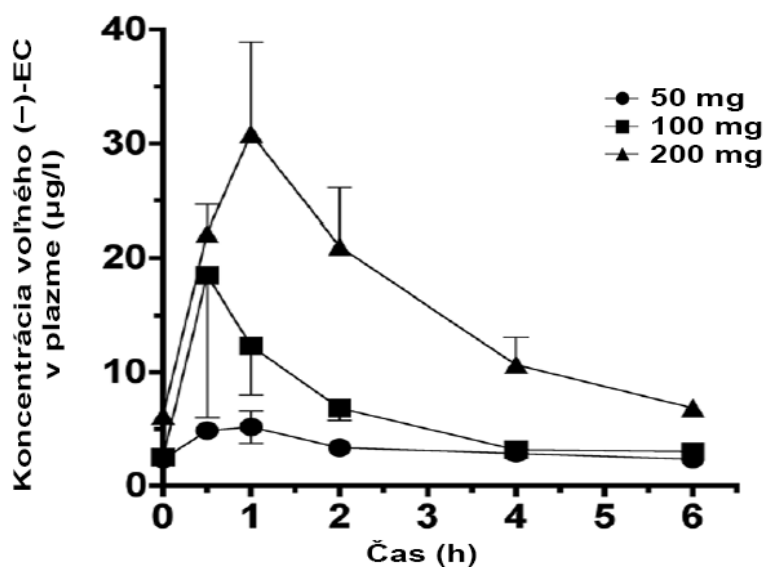
Obr. 12 Priemerné závislosti plazmatickej koncentrácie na čase voľného (–)–epigalokatechíngalátu (EGCG)

Po podaní 800 mg a 400 mg dávky čistého EGCG (horné dva grafy) a EGCG vo forme Polyfenonu E (spodné dva grafy). Vytvorené pred a po 4-týždňovom podávaní 800 mg jedenkrát denne a 400 mg dvakrát denne.

Prevzaté a upravené podľa: Chow et al. 2003

Tieto grafy (Obr. 12) okrem toho predkladajú dôkaz o vplyve dlhodobej suplementácie. Po podávaní nižšej 400 mg dávky epigalokatechíngalátu dvakrát denne sa po 4 týždňoch nevyskytli významné zmeny v AUC. Avšak po podávaní 800 mg v jednej dennej dávke sa zvýšila AUC viac ako o 60 %. Konkrétne z 96 ± 47 na 146 ± 85 min. $\mu\text{g}/\text{ml}$. Nie je to dôsledkom akumulácie v tele, pretože pri výpočtoch AUC bol akumulčný faktor braný do úvahy. Možnou príčinou by mohla byť inhibícia presystémovej eliminácie tohto katechínu a teda nárast biodostupnosti. Oproti tomu epikatechín a epigalokatechín, ktoré sú v krvi prevažne konjugované, po podaní Polyfenonu E nevykazovali zmeny. Rovnako bol zachovaný aj pomer voľnej a konjugovanej formy, takže opakované podávanie nemá na konjugáciu pravdepodobne vplyv (Chow et al. 2003).

Dávková závislosť bola dokázaná aj po podaní 50, 100 a 200 mg epikatechínu (Obr. 13) zdravým dobrovoľníkom (Barnett et al. 2015) a po podaní katechínu potkanom v piatich rôznych koncentráciách od 1 – 100 $\mu\text{mol}/\text{l}$ (Donovan et al. 2001).



Obr. 13 Graf závislosti plazmatickej koncentrácie na čase voľného (-)-epikatechínu
Po jednorazovom podaní dávok 50, 100 a 200 mg.
Prevzaté a upravené podľa: Barnett et al. 2015

Okrem toho sa u potkanov predtým prišlo na to, že pravdepodobne po podaní veľmi vysokých dávok (päťkrát zvýšená dávka oproti skúmanej), už nie je absorpcia dávkovo závislá. Existuje teda určitý limit, čo by bolo potrebné v budúcnosti viac preskúmať (Piskula a Terao 1998).

Efflux metabolitov v črevách

Jednou z možností zníženia absorpcie je efflux metabolitov vytvorených vnútri enterocytov späť do čreva (Crozier et al. 2006b, Zhang et al. 2004). Tento faktor bol skúmaný *in vitro* hlavne na katechínoch zeleného čaju (Vaidyanathan a Walle 2003, Zhang et al. 2004). Dôkazy existujú *in vivo* (Borges et al. 2016, Tsang et al. 2005), aj z intestinálnych perfúzných štúdií v jejune, vychádzajúcich z analýzy odobratého perfuzátu (Actis-Goretta et al. 2013). Taktiež súhlasia vyššie popísané štúdie u ileostomikov. Z celkových prijatých flavanolov zeleného čaju až 37 % metabolitov sa nachádzalo v ileálnej tekutine po 24 hodinách (Stalmach et al. 2010). Rovnako prítomné boli aj konjugáty v tekutinách zažívacieho traktu, prostredníctvom detekcie rádioaktivity v novších výskumoch (Ottaviani et al. 2016). Doterajšie výsledky sa zhodujú na tom, že hlavné effluxované metabolity sú vo forme nemetylovaných sulfátov (Actis-Goretta et al. 2013, Borges et al. 2013, Stalmach et al. 2010, Zhang et al. 2004). Práve sulfatácia v čreve je jednou z hlavných limitácií absorpcie (epi)galokatechínov. V určitých prípadoch sa sulfáty nepodarilo kvantifikovať (Auger et al. 2008). Či sú zlúčeniny effluxované, absorbované, prípadne akumulované vnútri epitelových buniek, závisí na povahe a pozícii konjugácie (Actis-Goretta et al. 2013, Vaidyanathan a Walle 2003).

Efflux prebieha aktívne cez transportéry na apikálnej membráne erytrocytov. *In vitro* štúdie sa zaoberali úlohou transportérov organických aniónov MRP 1 („multidrug resistance-associated protein 1“) a MRP 2 („multidrug resistance-associated protein 2“), monokarboxylátového transportéra MCT a P-glykoproteínu (Actis-Goretta et al. 2013, Vaidyanathan a Walle 2001, Vaidyanathan a Walle 2003). Transport modelom Caco 2 buniek prebieha v oboch smeroch, to znamená z apikálnej strany k bazolaterálnej (absorpcia) aj naopak (efflux). Na priblíženie schopnosti prieniku cez membránu slúži koeficient zdanlivej permeability (P_{app}), vypočítaný v spracovaných štúdiách podľa rovnice na Obr. 14. Prípadne sa vypočítal effluxný pomer P_{app} z bazolaterálnej na apikálnu $P_{appBtoA}$ (smer vylučovania) a z apikálnej na bazolaterálnu stranu $P_{appAtoB}$ (smer vstrebávania). Rozdiel medzi P_{app} v opačných smeroch by mal značiť o prítomnosti transportérov. P_{app} čajových katechínov v smere vstrebávania bol nízky, čo naznačuje nepriaznivý prechod membránou (Vaidyanathan a Walle 2001, Zhang et al. 2004). Pre zlúčeniny absorbované od 1 – 100 % sú hodnoty P_{app} $0,1 - 1,0 \times 10^{-6}$ cm/s (Artursson a Karlsson 1991).

$$P_{app} = dC/dt \times V / (A \times C_0)$$

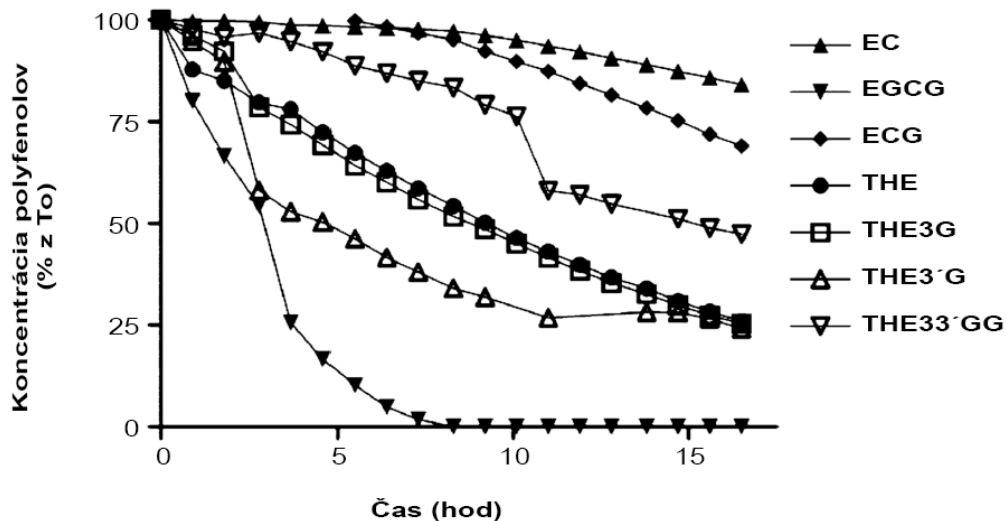
Obr. 14 Rovnica výpočtu koeficientu zdanlivej permeability

Vysvetlivky: P_{app} , koeficient zdanlivej permeability (cm/s); dC/dt , zmena koncentrácie v akceptorovom kompartmente za čas ($\mu\text{mol/l.s}$); V , objem roztoku v akceptorovom kompartmente (cm^3); A , plocha membrány ($1,13 \text{ cm}^2$); C_0 , počiatočná koncentrácia v donorovom kompartmente ($\mu\text{mol/l}$).

Prevzaté z: Vaidyanathan a Walle 2001

Vplyv pH na stabilitu

Nestabilita v závislosti na pH v tráviacom trakte sa skúmala u čajových katechínov, ako jeden z faktorov spôsobujúcich nízku biodostupnosť. V *in vitro* podmienkach sa u nariadenej zmesi flavanolov (cca $30 \mu\text{mol/l}$) pri vystavení pH 7 (podobné tenkému črevu), zistila rastúca stabilita v tomto poradí: epigalokatechíngalát < epigalokatechín < epikatechíngalát < epikatechín. Negaloylované zlúčeniny sú stabilnejšie. Pre kompletizáciu čajových katechínov, do porovnania zahrnuli aj: teaflavín, teaflavín-3-O-galát, teaflavín-3'-O-galát, a teaflavín-3,3'-O-digalát. (Henning et al. 2008). Výsledná stabilita je graficky znázornená na Obr. 15.



Obr. 15 Stabilita čajových katechínov a teaflavínov

Inkubácia pri pH 7 po dobu 16 hodín. Skratky: EC, epikatechín; EGCG, epigalokatechíngalát; ECG, epikatechíngalát; THE, teaflavín; THE3G, teaflavín-3-O-galát; THE3'G, teaflavín-3'-O-galát; THE33'GG, teaflavín-3,3'-O-digalát; T_0 , koncentrácia v čase 0.

Prevzaté a upravené podľa: Henning et al. 2008

Metylované formy by mali mať stabilitu vyššiu (skúmané na epigalokatechíne). Nízka je príčinou dimerizácie, tvorby peroxidu vodíka, autooxidácie a degradácie. Môže mať

vplyv aj na absorpciu. U najmenej stabilného epigalokatechíngalátu a epigalokatechínu došlo k 50 % degradácii po 2 – 3 hodinách (Henning et al. 2008). Výsledky súhlasia s predchádzajúcim výskumom, pri ktorom sa rovnako ukázal byť epikatechín najviac, a epigalokatechíngalát najmenej stabilný pri pH 7,4 (Vaidyanathan a Walle 2001). Do budúcnosti by bolo vhodné preskúmať aj stabilitu konjugátov flavanolov.

Matricové efekty, vplyv zložiek potravy

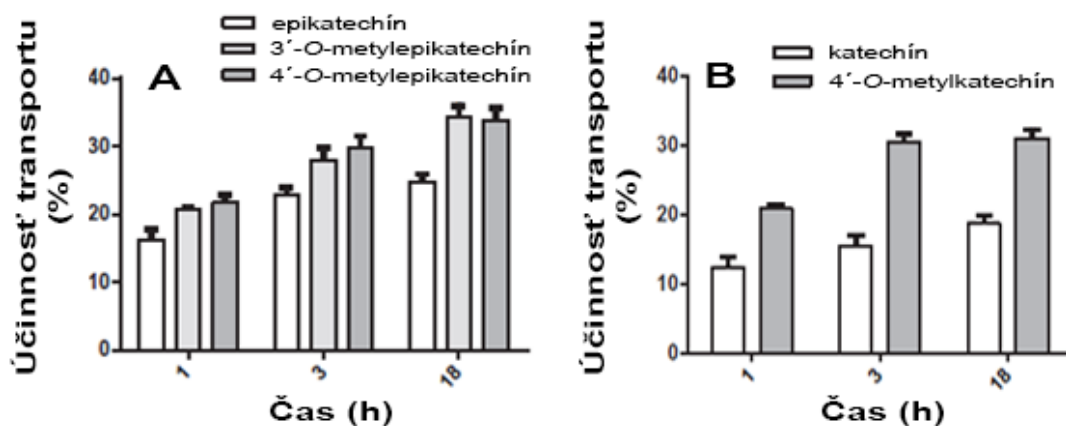
Úloha potravinovej matrice nie je objasnená. Je zložité interpretovať výsledky viacerých štúdií, v dôsledku jej rozmanitosti. Podávali sa rôzne druhy zeleného čaju, tmavej čokolády či vína, prípadne iné upravené výťažky. Z potravín sa musí pred vstrebaním zlúčenina najskôr uvoľniť. Mnohí autori to neberú do úvahy. Niektorí sa snažili týmto vplyvom predísť úplne. Napríklad Ottaviani et al. (2016) si za matricu zvolili obyčajnú vodu, za účelom čo najpresnejších výsledkov. Iní zámerne podávali testovací nápoj s potravou, napríklad s bielym chlebom, tabletami glukózy či syrom. V tomto prípade nenašli významný vplyv na absorpciu (Auger et al. 2008).

Po podaní Polyfenonu E (800 mg epigalokatechíngalátu) v tobolkách ráno nalačno, sa zistila až 3,5-krát vyššia c_{\max} voľného epigalokatechíngalátu (c_{\max} 1522 ng/ml, AUC 254 min.µg/ml), v porovnaní s konzumáciou po raňajkách (c_{\max} 294 ng/ml, AUC 91 min.µg/ml). Rovnako poklesla po jedle c_{\max} voľného epikatechíngalátu, celkového epikatechíngalátu a epigalokatechíngalátu (voľný + konjugovaný). Čo sa týka voľného epikatechínu a epigalokatechínu, pokles bol bezvýznamný. Paradoxne plazmatické a močové hladiny celkového epigalokatechínu (c_{\max} 136 ng/ml nalačno, c_{\max} 177 ng/ml po jedle) a epikatechínu (c_{\max} 150 ng/ml nalačno, c_{\max} 234 ng/ml po jedle) vzrástli. Význam však opäť nebol úplne objasnený. Negaloylované formy sa vyskytujú hlavne konjugované. Takže nárast celkových hladín po jedle, znamená nižšiu tvorbu dostupných metabolitov nalačno. Je zložité porovnávať výsledky s inými, keďže sa skúmal príjem len po jednom druhu potravy. Možný je však vplyv pH, ktorého hodnoty sa líšia v prítomnosti jedla. Ďalej potrava spomaľuje vyprázdňovanie žalúdka (Chow et al. 2005).

5 Distribúcia

Absorbované zlúčeniny môžu byť vylúčené alebo distribuované do okolitých tkanív. Prestup flavanolov cez membrány je menej preskúmaný. Po orálnom podaní výťažku hroznových jadierok bohatých na flavanoly potkanom sa zistilo, že väčšina metabolitov je po 2 hodinách prítomná v obličkách (celkovo 300 – 900 nmol/g), takmer 3-krát menej v pečeni, a pod 40 nmol/g v mezenterickom tukovom tkanive a v mozgu. Koncentrácie sú závislé na dávke a zastúpenie metabolitov špecifické pre konkrétne tkanivá (Margalef et al. 2015). Okrem toho bola popísaná distribúcia hlavných flavanolov výťažku z hroznových jadierok v placentе. Koncentrácie voľných flavanolov sa líšili po 2 hodinách od 3,1 nmol/g (PB2) do 13,3 nmol/g (epikatechín). Detekované boli aj v plode a amniotickej tekutine u potkaních samíc, avšak koncentrácie boli buď veľmi nízke, alebo sa nedali kvantifikovať. V placentе boli najviac zastúpené glukuronidy a metylované formy epikatechínu a katechínu (Arola-Arnal et al. 2013).

Transmembránový prenos sa potvrdil na modeloch hematoencefalickej bariéry (HEB). Jedným z nich je hCMEC/D3 bunková línia („human cerebral microvessel endothelial cell line“), imortalizovaná línia ľudských kapilárnych mozgových endotelových buniek. Epikatechín a katechín sú schopné prestupovať touto bariérou. Transport je stereoselektívny, epikatechín prestupuje viac. Časovo závislý prenos 3'-*O*-metylepikatechínu, 4'-*O*-metylepikatechínu a 4'-*O*-metylkatechínu bol vyšší, asi vďaka vyššej lipofilite, porovnanie vid' Obr. 16. Okrem pasívnej difúzie sa predpokladá zapojenie transportérov (Faria et al. 2014).



Obr. 16 Účinnosť transportu cez hCMEC/D3 bunky v závislosti na čase
 A/ 30 $\mu\text{mol/l}$ epikatechínu, 3'-*O*-metylepikatechínu, 4'-*O*-metylepikatechínu a B/ 30 $\mu\text{mol/l}$ katechínu a 4'-*O*-metylkatechínu. Percentuálna účinnosť vypočítaná ako pomer koncentrácie zlúčeniny na bazolaterálnej strane v danom čase a počiatkovej koncentrácie na apikálnej.
 Prevzaté a upravené podľa: Faria et al. 2014

U potkanov sa rovnako potvrdil vyšší prestup metabolitov epikatechínu. Metylované formy boli zastúpené najviac. Koncentrácie metabolitov v mozgu a zároveň dávková závislosť je zobrazená v Tab. 5 (Margalef et al. 2015).

Tab. 5 Metabolity epikatechínu a katechínu II. fázy metabolizmu detekované v mozgovom tkanive po dvoch hodinách od podania

250 mg/kg GSPE		375 mg/kg GSPE	
EC	množstvo (nmol/g)	EC	množstvo (nmol/g)
Glc	1,59 ± 0,21	Glc	2,47 ± 0,28
Me-Glc	0,46 ± 0,03	Me-Glc	0,85 ± 0,14
3'-O-Me	7,05 ± 0,76	3'-O-Me	7,93 ± 0,95
4'-O-Me	6,19 ± 0,56	4'-O-Me	7,98 ± 1,27
CA	množstvo (nmol/g)	CA	množstvo (nmol/g)
Glc	0,75 ± 0,05	Glc	1,26 ± 0,31
Me-Glc	0,44 ± 0,04	Me-Glc	0,68 ± 0,30

Vysvetlivky: GSPE („grape seed polyphenol extract“), výťažok polyfenolov z hroznových jadierok; EC, epikatechín; CA, katechín; Glc, glukuronid; Me, metyl.

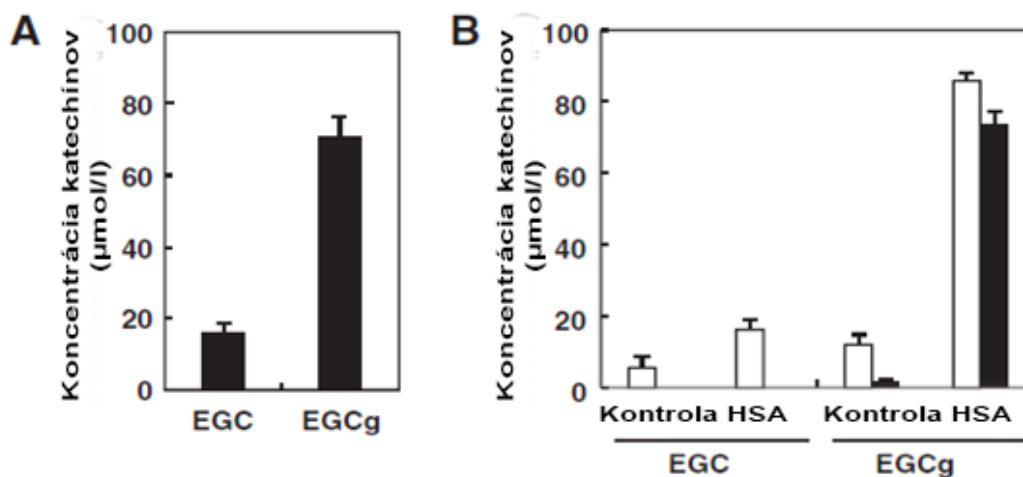
Údaje prevzaté z: Margalef et al. 2015

Prítomnosť glukuronidu a 3'-O-metylovaného glukuronidu v mozgovom tkanive sa zistila po skúmaní prestupu 100 mg/kg (-)-epikatechínu cez HEB u potkanov po orálnom podaní. Kvantifikácia ani popis prestupu sa však nepodarili (Abd El Mohsen et al. 2002).

Po podaní [2-¹⁴C](-)-epikatechínu potkanom bola detekovaná rádioaktivita mimo tráviaceho traktu v mozgu, semenníkoch, slezine, srdci, svaloch a pľúcach. Hodnoty neprekročili 0,1 % z podaného množstva (Borges et al. 2016).

Vplyv na distribúciu flavanolov do tkanív má väzba na ľudský sérový albumín, hlavný transportný proteín. Táto reverzibilná väzba ovplyvňuje napríklad: voľnú frakciu v plazme, koncentrácie, vylučovanie a je miestom interakcií. Afinita k albumínu je závislá na štruktúre. Galáty majú vyššiu afinitu ako negaloylované zlúčeniny. Deriváty pyrogalolu majú vyššiu afinitu ako deriváty katecholu, teda s prítomnosťou viacerých hydroxylových skupín na kruhu B sa zvyšuje. Epigalokatechíngalát má afinitu v skupine najvyššiu (Ishii et al. 2010).

Po porovnaní epigalokatechíngalátu s jeho metylovanými derivátmi: 4''-*O*-metyl, 3''-*O*-metyl a 4'-*O*-metyl, došlo k poklesu afinity s prítomnou metyláciou. Používala sa HPLC analýza so špeciálnou HSA („human serum albumin“) kolónou (Ishii et al. 2010). Táto interakcia by mohla mať naň stabilizujúci vplyv pri transporte k cieľovým tkanivám. Stabilita epigalokatechíngalátu a epigalokatechínu po 1 hodine inkubácie v ľudskom sére a v tlmivom roztoku s albumínom je zobrazená na Obr. 17. Oproti epigalokatechínu sa epigalokatechíngalát ukázal byť stabilný v oboch prípadoch. Ďalej je zobrazená stabilita epigalokatechíngalátu pri dvoch rôznych pH (Ishii et al. 2011). Súvislosti by sa mali preskúmať v reálnych podmienkach.



Obr. 17 Stabilizácia katechínov ľudským sérovým albumínom

EGC, epigalokatechín; EGCg, epigalokatechíngalát; HSA, ľudský sérový albumín. **A/** stabilita v ľudskom sére po podaní 100 μmol/l zlúčeniny pri 37 °C po dobu 60 minút; **B/** stabilita po inkubácii 100 μmol/l zlúčeniny vo fosfátovom pufrí (100 mmol/l) s ľudským sérovým albumínom (30,0 mg/ml) pri 37 °C po dobu 60 minút. Biele stĺpce pri pH 7,4 a čierne stĺpce pri pH 8,0.

Prevzaté a upravené podľa: Ishii et al. 2011

6 Metabolizmus

Najdôležitejšími orgánmi metabolizmu flavanolov sprostredkovaného ľudskými enzýmami sú črevo a pečeň. Určité premeny prebiehajú aj v obličkách (Crozier et al. 2006b). Zlúčeniny obsahujú viaceré polárne skupiny, preto prevažuje až II. fáza metabolizmu, konjugácia s endogénnymi molekulami. Medzi základné metabolické premeny patrí: glukuronidácia, sulfatácia a metylácia. Potvrdzujú to mnohé dôkazy o hlavných metabolitoch, ktoré sa podarilo identifikovať a kvantifikovať: glukuronidy, sulfáty, metylované zlúčeniny alebo ich kombinácie (Barnett et al. 2015, Piskula a Terao 1998). Výsledky dostupných štúdií sa líšia v ich zastúpení aj v množstve. Môže za to pravdepodobne viac faktorov, a to medzilaboratórne, ale aj individuálne rozdiely (vek, BMI, pohlavie, genetika). Rovnako záleží na vyššie vymenovaných faktoroch ovplyvňujúcich absorpciu (Ottaviani et al. 2012b, Ottaviani et al. 2016).

6.1 Metabolizmus v tenkom čreve a v pečeni

Metabolizmus monomérov začína už v enterocytoch a je rozsiahly (Crozier et al. 2006b, Barnett et al. 2015). U galátov je nižší (Chow et al. 2005) a u PA minimálny, prípadne žiadny (Gonthier et al. 2003). Osud vytvorených metabolitov má viacero možností. Buď sú vstrebané do obehu bazolaterálnym povrchom a pokračujú portálnou žilou do pečene, alebo sú vylúčené späť do čreva apikálnym povrchom (podkapitola 4.2, efflux metabolitov v črevách). Effluxované sú hlavne sulfáty, glukuronidy majú najvyššie zastúpenie v plazme (Actis-Goretta et al. 2013, Lee et al. 2002).

Je preukázané, že tenké črevo je hlavným orgánom glukuronidácie flavanolov (Crozier et al. 2006b). Skupina enzýmov UDP-glukuronyltransferáz (UGT) patrí k enzýmom katalyzujúcim konjugáciu s kyselinou glukurónovou. Presnejšie, katalyzujú jej prenos z kofaktoru UDP-glukurónovej kyseliny na nukleofilné miesto substrátov, v tomto prípade hydroxylové skupiny. Enzýmy sú lokalizované na bazolaterálnej strane, okrem čreva aj v pečeni a v obličkách. V II. fáze metabolizmu prevládajú hlavne rodiny UGT1A a UGT2B (Rowland et al. 2013, Spencer et al. 1999, Ziegler et al. 2015).

Úloha UGT bola dokázaná najskôr *in vitro* na izolovanom jejune potkanov (Kuhnle et al. 2000, Spencer et al. 1999) a na modelových kultúrach črevných a pečenevých buniek. V tomto prípade sa pokúsili odhadnúť presnejšie intracelulárne umiestnenie. Izoforma

UGT1A9 je lokalizovaná v membráne endoplazmatického retikula črevných a pečenevých buniek. UGT1A8 sa nachádza aj v plazmatickej membráne, hlavne na bazolaterálnej strane črevných buniek. Po podaní (-)-epikatechínu na apikálnu stranu prebiehala glukuronidácia menej, než po aplikácii na bazolaterálnu (Ziegler et al. 2015).

U potkanov sa taktiež potvrdila vysoká aktivita UGT v črevnej mukóze, výrazne v jejune a ileu. V menšej miere začala už v duodene. Dôležitá je aj v hrubom čreve (Borges et al. 2016, Piskula a Terao 1998). Ide o najrýchlejšiu reakciu (Harada et al. 1999). Po porovnaní s viacerými výsledkami sa predpokladá, že glukuronidácia je limitovaná určitou podanou dávkou. U veľmi vysokých dávok stúpali c_{\max} nekonjugovaného epikatechínu. Pri zvýšení dávky zo 172 $\mu\text{mol/kg}$ na 860 $\mu\text{mol/kg}$ sa zvýšila jeho c_{\max} až 8-krát a c_{\max} glukuronidov len približne 2,5-krát (Piskula a Terao 1998).

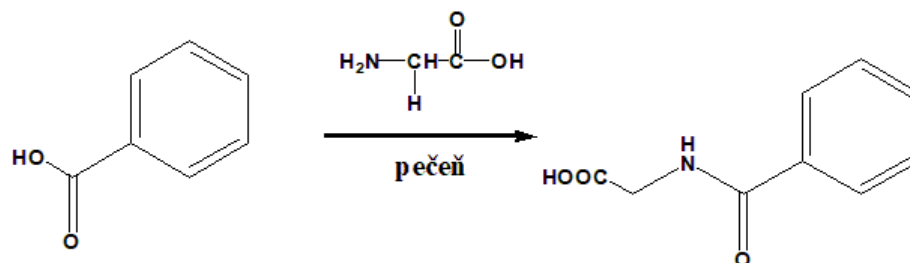
Druhou reakciou prebiehajúcou už v enterocytoch a významne v pečeni je sulfatácia katalyzovaná sulfotransferázami (SULT). Sú to enzýmy s vysokou substrátovou špecifickosťou, hlavnou funkčnou skupinou je pre ne hydroxyl. Na metabolizme flavanolov sa pravdepodobne podieľajú predovšetkým izoformy SULT1A1, SULT1A3 (Huang et al. 2009, Vaidyanathan a Walle 2002). Prevažuje poloha 3' (Actis-Goretta et al. 2013, Ottaviani et al. 2016). Rovnako sulfatácia je dávkovo limitovaná. Pri podaní vysokých dávok prebieha metabolizácia smerom ku glukuronidácii, ktorá má teda vyššiu kapacitu (Piskula a Terao 1998). Znížená tvorba sulfátov by mohla byť následkom inhibície niektorých izoformi SULT vo vyšších koncentráciách (Huang et al. 2009).

U ľudí je vyššia aktivita SULT v čreve než u potkanov. V staršej výskumnej práci pri skúmaní enzymatickej aktivity u potkanov bola dokonca pečeň označená ako jediný orgán s prítomnou aktivitou SULT (Piskula a Terao 1998). Pri perfúzných štúdiách s epikatechínom na izolovanom tenkom čreve potkanov neboli sulfáty vôbec detekované (Kuhnle et al. 2000).

Metylácia v enterocytoch prebieha v menšej miere (Crozier et al. 2006b), hlavne v jejune (Kuhnle et al. 2000). Aktivita katechol-*O*-metyltransferázy (COMT) je vyššia v pečeni a menej výrazná v obličkách u potkanov (Harada et al. 1999, Piskula a Terao 1998). Časovo patrí k neskorším reakciám a prebieha najviac v polohe 3', prípadne 4' (Baba et al. 2001). U ľudí často sprevádza ostatné konjugáčné reakcie, čo bude popísané pri konkrétnych látkach. Vyskytujú sa ale aj voľné metylované formy. U potkanov je

jeden z hlavných metabolitov metylovaný epikatechín (Baba et al. 2001, Borges et al. 2016). Na rozdiel od glukuronidácie a sulfatácie, sa zistila metylácia *in vitro* u oligomérov. Dochádzalo pravdepodobne ku kompetícii enzýmu s monomérmí. Naopak vysoké koncentrácie dimérov, cez 300 $\mu\text{mol/l}$, inhibovali COMT (Spencer et al. 2001).

Do pečene sa dostávajú hlavne glukuronidy, prípadne metylované glukuronidy flavanolov (Crozier et al. 2006b), čo súhlasí s tvrdením o prevažujúcej glukuronidácii v tenkom čreve. Pečeň je okrem popísaných reakcií miestom významnej premeny benzoovej kyseliny na hippurovú (Borges et al. 2016, Gonthier et al. 2003). Kyselina benzoová sa dostáva až sem, kde je konjugovaná s glycínom (Aura et al. 2008). Následne sa vylučuje obličkami do moču. Jej prítomnosť sa dokázala *in vivo* aj *in vitro* (Mulder et al. 2005, Roowi et al. 2010). Priebeh reakcie znázorňuje Obr. 18.



Obr. 18 Konjugácia kyseliny benzoovej s glycínom za vzniku kyseliny hippurovej
 Prevzaté a spracované podľa: Mulder et al. 2005

6.2 Metabolizmus v hrubom čreve, úloha bakteriálnej mikroflóry

Značné množstvo flavanolov sa dostane do hrubého čreva nezmenené, spolu s časťou metabolitov effluxovaných v tenkom čreve (Actis-Goretta et al. 2013). Tu podliehajú metabolizácii a degradácii. Významnú úlohu zohráva bakteriálna mikroflóra. Jednoduchšie zlúčeniny vzniknuté rozkladom bakteriálnymi enzýmami môžu byť v hrubom čreve vstrebané a následne konjugované, alebo vylúčené (Borges et al. 2016, Ottaviani et al. 2016). Ich koncentrácie v moči dokonca prekračujú koncentrácie metabolitov s nedotknutým flavanolovým kruhom (Del Rio et al. 2010, Mulder et al. 2005). Baktérie produkujú aj glykozidázy, glukuronidázy a sulfatázy (Hollman 2004).

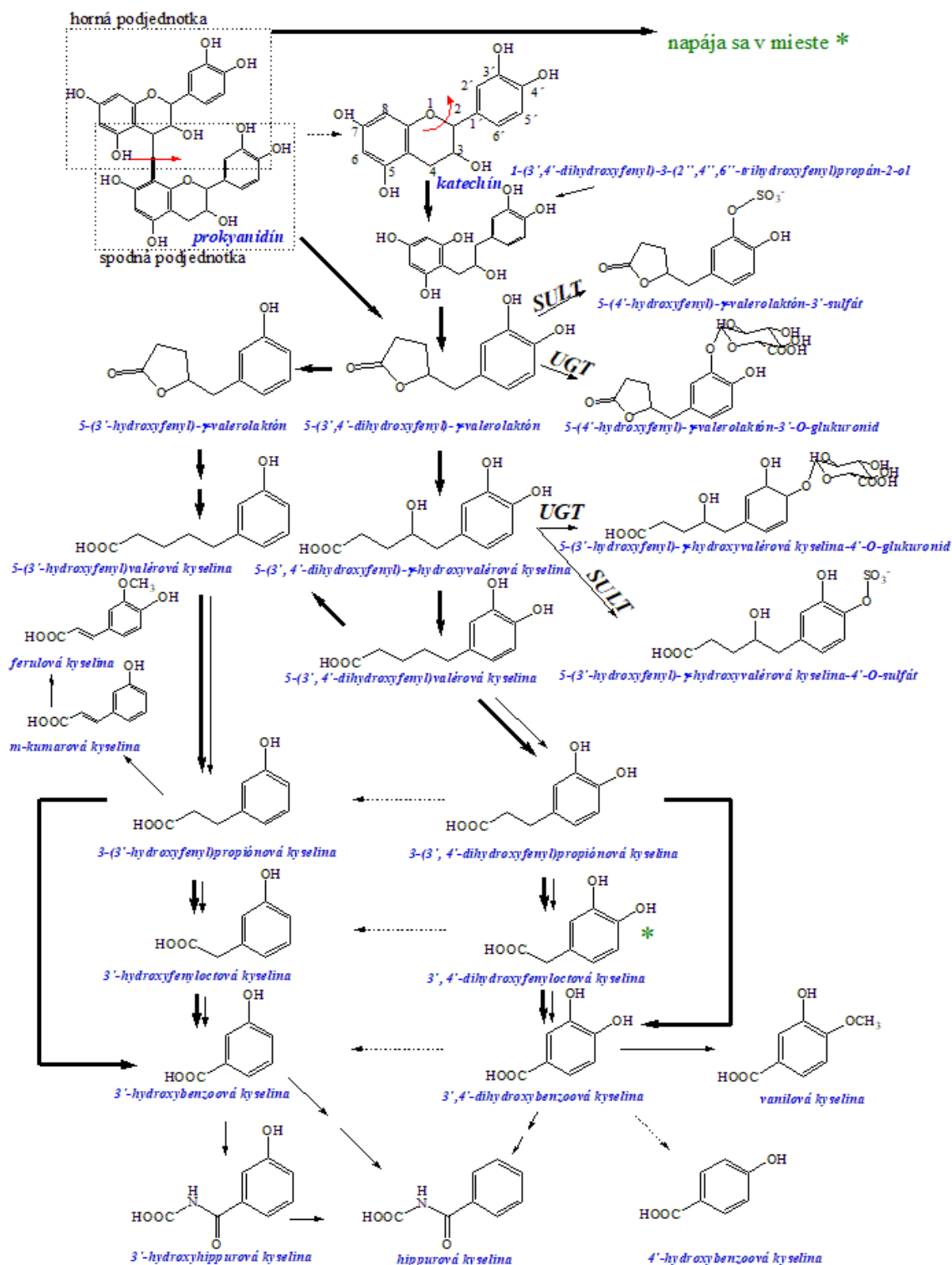
Bakteriálny rozklad na fenolické kyseliny je závislý na polymeračnom stupni. Nízka mikrobiálna degradácia sa vysvetľuje rôzne. Na jednej strane by mohla byť spôsobená nižšou prístupnosťou substrátu, na strane druhej antimikrobiálnymi vlastnosťami PA, inhibujúcimi metabolizujúce enzýmy baktérií (Déprez et al. 2000, Gonthier et al. 2003).

Ďalej je závislý na kmeni baktérií, väčšina je striktno anaeróbných. Katechín sa ukázal byť voči niektorým odolný, na rozdiel od kvercetínu, naringenínu a kempferolu. Žiadny zo skúmaných kmeňov nedokázal rozštiepiť jeho kruh (Winter et al. 1989). Závisí aj na individuálnom zložení mikroflóry ovplyvnenom faktormi ako je zdravotný stav, podávané liečivá, zloženie stravy či vek (Aura et al. 2008, Del Rio et al. 2010).

Produktami sú metabolity s rozštiepeným kruhom, v literatúre označované ako RFMs („ring fission metabolites“). Vznikajú laktóny a fenolické až aromatické kyseliny. Všetky môžu byť ľahšie vstrebané do obehu (Actis-Goretta et al. 2013, Ottaviani et al. 2016, Winter et al. 1989). Predtým sú zvyčajne konjugované enzýmami v stene hrubého čreva, následne v pečeni, či v obličkách. RFMs sa môžu v telesných tekutinách vyskytovať ako glukuronidy alebo sulfáty. Hlavné RFMs sú deriváty: 5-(3',4'-dihydroxyfenyl)- γ -valerolaktónu a 5-(3',4'-dihydroxyfenyl)- γ -hydroxyvalérovej kyseliny (Ottaviani et al. 2016). U galokatechínov je prítomný 3',4',5'-trihydroxyfenyl (Roowi et al. 2010). V tomto prípade tvorí alifatický reťazec päť uhlíkov, označujú sa ako 5C-RFMs („5 carbon side chain ring fission metabolites“). 3/1C-RFMs („3 to 1 carbon side chain ring fission metabolites“) majú reťazec z jedného až troch uhlíkov, napríklad: 3-(3',4'-dihydroxyfenyl)propiónová kyselina, 3-(3'-hydroxyfenyl)-3-hydroxypropiónová kyselina, deriváty kyseliny octovej, alebo konjugáty benzoovej: hippurová, 3'/4'-hydroxyhippurová (Aura et al. 2008, Borges et al. 2016, Ottaviani et al. 2016).

Mikrobiálny pôvod metabolitov bol skúmaný *in vitro* inkubáciou so stolicou. Existujú aj isté limitácie. Pri odoberaní vzoriek môže dochádzať napríklad k zmene v bakteriálnom zložení oproti skutočnému v lumen čreva, takisto nie sú prítomné enzýmy mukózy čreva podieľajúce sa na metabolizme (Roowi et al. 2010). Tieto výskumy môžu ale pomôcť s odhadom potenciálne prebiehajúcich ciest.

Na Obr. 19 sú naznačené potenciálne cesty tvorby rozkladných produktov a najčastejšie identifikované štruktúry v štúdiách. Reakcií sa zúčastňuje bakteriálna mikroflóra a enzýmy v čreve, v pečeni, v obličkách. Dochádza k štiepeniu flavanolového kruhu C, kruhu A, skracovaniu reťazca, oxidačno-redukčným, hydroxylačným a dehydroxylačným reakciám. Okrem toho sú rozkladné produkty väčšinou konjugované (Borges et al. 2016). Metabolizmus je zložitý a komplexný, dodnes nie je kompletne popísaný.



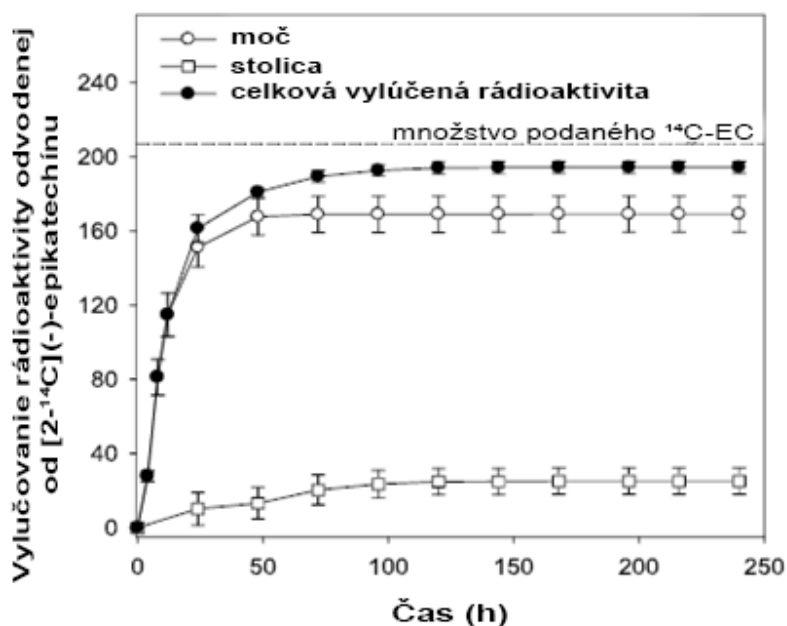
Obr. 19 Potenciálne premeny proantokyanidínov a katechínov na rozkladné produkty
 Šípky: hrubé, potenciálne mikrobiálne reakcie; tenké, reakcie prebiehajúce za katalýzy enzýmami ľudských/potkaních buniek; hrubá a tenká, možný priebeh jednou lebo druhou cestou; prerušované, menej časté premeny. Nie sú vyznačené všetky reakcie, konjugácia naznačená len u vybraných metabolitov. Samotná 4'-hydroxylácia sa vyskytuje menej.
 Spracované podľa: Appeldoorn et al. 2009a, Borges et al. 2016, Del Rio et al. 2013, Gonthier et al. 2003, Ottaviani et al. 2016, Roowi et al. 2010

7 Exkrécia

Existujú dve hlavné cesty vylučovania flavanolov: renálna a biliárna. Prevažuje renálna, takže hlavným orgánom sú obličky. Zlúčeniny absorbované do cirkulácie sa nekumulujú. Sú relatívne rýchlo eliminované z plazmy, prevažne vo forme konjugátov. Vysoké výťažky metabolitov (epi)katechínu v moči sa potvrdili vo viacerých štúdiách flavanolov kakaa aj čaju (Del Rio et al. 2013). Doba, za akú sa vylúčia, závisí na ich štruktúre a taktiež na druhu podanej látky (Lee et al. 2002).

Konjugáty s nedotknutým kruhom sa vylučujú v moči najviac v priebehu prvých 4 hodín, väčšina už nie je v prítomná po 8 – 10 hodinách, do 24 hodín sa vylúčia úplne. Hodnoty $T_{1/2}$ sa pohybujú priemerne okolo 2 hodín. 5C-RFMs sa vylučujú neskôr, najviac medzi 4. až 12. hodinou, niektoré sú prítomné aj po 24 hodinách. $T_{1/2}$ je v priemere 6 hodín. Až nakoniec sa vylučujú 3/1-RFMs s maximom 12 – 24 hodín, úplné vylúčenie do dvoch dní. Koncentrácie polyhydroxyfenyl- γ -valerolaktónov výrazne prevyšujú koncentrácie ostatných metabolitov flavanolov v moči (Del Rio et al. 2010, Ottaviani et al. 2016). Vylučovanie RFMs sa veľmi líši u jednotlivých subjektov (Calani et al. 2012).

Rozdiel vo vylučovaní močom a stolicou zobrazuje Obr. 20 prostredníctvom rádioaktivity prítomnej v moči a stolici po podaní $[2-^{14}\text{C}](\text{-})$ -epikatechínu človeku (Ottaviani et al. 2016).



Obr. 20 Rozdiel v exkrécii rádioaktivity po podaní $[2-^{14}\text{C}](\text{-})$ -epikatechínu (^{14}C -EC) u človeka

Prevzaté a upravené podľa: Ottaviani et al. 2016

Vylučovanie žlčou u negaloylovaných monomérov prebieha minimálne. Perfúznou metódou po podaní 50 mg (-)-epikatechínu u ľudí bolo 2,6 – 18 µg metabolitov detekovaných v žlči po 2,5 hodinách (maximum pozorované po 90 minútach), nepatrné množstvo oproti 1 – 6 mg metabolitov v moči. Sú prítomné aj veľké individuálne rozdiely (Actis-Goretta et al. 2013). Naopak galáty sa vylučujú hlavne žlčou (Chen et al. 1997, Lee et al. 2002). Po intravenóznom podaní dekofeínovaného zeleného čaju (25 mg/kg) potkanom, mal epigalokatechíngalát relatívne vysoké hodnoty AUC v čreve oproti obličkám (Chen et al. 1997).

8 Podrobnejšie údaje o vybraných predstaviteľoch

8.1 Epikatechín

(–)-Epikatechín sa rýchlo vstrebáva zo zažívacieho traktu (Barnett et al. 2015, Wiese et al. 2015). Voľná forma sa vyskytuje v plazme len vo veľmi nízkych koncentráciách oproti metabolitom (Harada et al. 1999, Chow et al. 2005, Ottaviani et al. 2012b, Piskula a Terao 1998), prípadne vôbec nebola detekovaná (Actis-Goretta et al. 2012), alebo bola detekovaná až po podaní vyššieho množstva (–)-epikatechínu (Barnett et al. 2015). Biologická dostupnosť je nízka. Základné farmakokinetické parametre po podaní čistej zlúčeniny ľuďom a závislosť na podanom množstve zobrazuje Tab. 6.

Tab. 6 Farmakokinetické parametre (–)-epikatechínu po jednorazovom podaní u ľudí

	50 mg	100 mg	200 mg
c_{max} ($\mu\text{g/l}$)	5,8	20,7	34,5
t_{max} (h)	0,5	0,5	1,0
$t_{1/2}$ (h)	–	2,5	2,5
k_{el} (h^{-1})	–	0,277	0,277
AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h/l}$)	–	58,1	122,4

Vysvetlivky: c_{max} , maximálna koncentrácia v plazme; t_{max} , čas dosiahnutia maximálnej koncentrácie; $t_{1/2}$, plazmatický polčas; k_{el} , konštanta eliminácie; AUC, plocha pod krivkou.

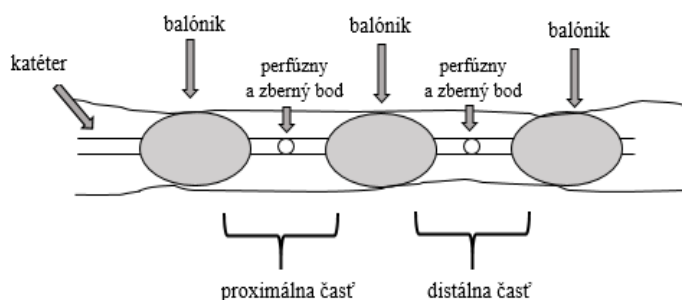
Dáta spracované podľa: Barnett et al. 2015

Už pri prechode črevnými bunkami podlieha (–)-epikatechín rozsiahlym metabolickým premenám. Svedčí o tom počet detekovaných metabolitov. V najnovších štúdiách ich je až cez 20 v plazme a v moči (Borges et al. 2016, Ottaviani et al. 2016).

Väčšinou ide o krátkodobé štúdie s jednorazovým podaním. Zistilo sa, že metabolizácia (–)-epikatechínu nie je ovplyvnená ani po dlhšom podávaní. Konkrétne po podávaní dávok 50 – 200 mg (–)-epikatechínu počas 5 dní sa farmakokinetické parametre významne nelíšili (Barnett et al. 2015). K rovnakému záveru sa dospelo aj na základe výsledkov pred a po 4-týždňovom podávaní (–)-epikatechínu vo forme Polyfenonu E (Chow et al. 2003). Oproti tomu po 5-dňovom a 10-dňovom podávaní u potkanov, sa menil pomer metylovaných a nemetylovaných zlúčenín, v prospech metylovaných. Presná príčina nebola určená, mohlo ísť o vyššiu stabilitu, akumuláciu metylovaných foriem alebo dlhší polčas eliminácie (Abd El Mohsen et al. 2002).

8.1.1 Rôzne spôsoby skúmania absorpcie

Čo sa týka rozsahu absorpcie, hodnoty nie sú jednoznačné. Skúmajú sa odlišnými postupmi. Jedným z nich sa skúmalo vstrebávanie v izolovanej časti jejuna, po podaní 50 mg čistého (–)-epikatechínu prostredníctvom orálneho zavedenia multilumenálneho perfúzneho katétra. Princípom bolo vytvorenie dvoch prilahlých segmentov nafúknutím propylénových balónov, ktoré ich oddeľovali (Actis-Goretta et al. 2013), schematicky znázornené na Obr. 21.



Obr. 21 Schematické znázornenie multilumenálneho perfúzneho katétra v jejune
 Prevzaté a upravené podľa: Actis-Goretta et al. 2013

Substrát sa podal do proximálneho alebo distálneho segmentu. Po intervaloch sa odoberal perfuzát. Ako ukazovateľ úplnosti oklúzie, skúšobná látka s optimálnou biodostupnosťou (po orálnom podaní cez 95 %) a dôkaz zrovnateľnej absorpcie z oboch segmentov, sa pridávali antipyrín a $[^2\text{H}_3]$ antipyrín. Zároveň sa merala intestinálna permeabilita P_{eff} , vyjadrujúca rozdiel koncentrácie látky vstupujúcej a vystupujúcej z ohraničeného segmentu. Hodnota vyjadruje transportný spád stenou. Výsledky touto technikou zaznamenali približne 46 % absorpciu v jejune, s individuálnymi rozdielmi od 31 % do 90 % (Actis-Goretta et al. 2013). Tu je vidieť obrovskú individuálnu variabilitu.

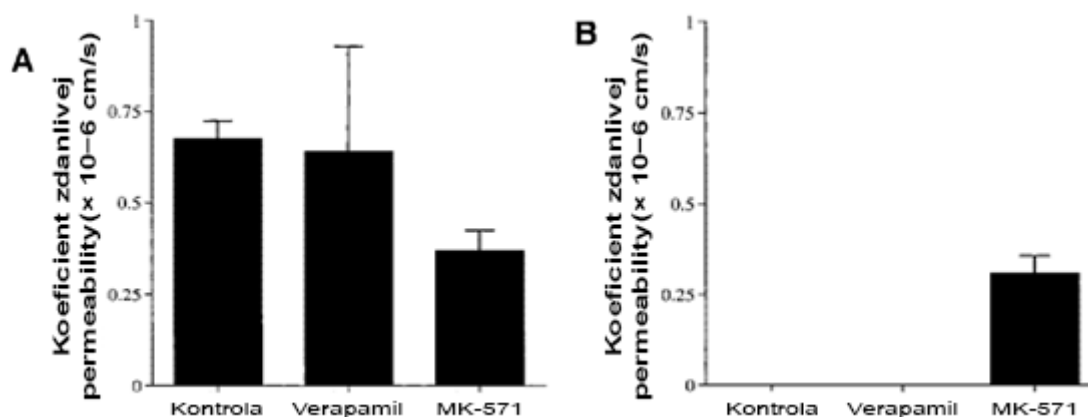
Vysokú mieru absorpcie vykazujú pomerne nové štúdie skúmajúce farmakokinetiku po podaní rádioznačeného $[2\text{-}^{14}\text{C}](\text{–})$ -epikatechínu potkanom aj ľuďom. Zdravým dobrovoľníkom bolo podaných 50 ml vodného roztoku $[2\text{-}^{14}\text{C}](\text{–})$ -epikatechínu, obsahujúceho 300 μCi rádioaktivity a 60 mg (207 μmol) (–)-epikatechínu. Až 82 ± 5 % pohltenej rádioaktivity sa vylúčilo v moči. Tento odhad sa zhoduje s 90 ± 8 % výt'azkom rádioznačených metabolitov v moči. Okrem toho 12 ± 3 % sa vylúčilo fekálne. Touto metódou bol umožnený aj detailnejší popis miesta vstrebávania. Len 20 ± 2 % z prijatého množstva sa vstrebalo z tenkého čreva a najviac v kolóne, až 70 % (Ottaviani et al. 2016). O niečo nižší rozsah vstrebávania bol popísaný u potkanov po intragastrickom podaní

pomocou žalúdočnej sondy, a to 76 – 78 %. Maximálna hodnota rádioaktivity sa namerala v plazme po 1 hodine od podania (Borges et al. 2016), u ľudí po 0,8 – 1,4 hodine (Ottaviani et al. 2016), čo súhlasí s predchádzajúcimi výsledkami. Napriek tomu zaznamenané hodnoty v plazme v ktoromkoľvek čase neprekročili 1 % pohltenej rádioaktivity u potkanov (Borges et al. 2016) a podobne hodnoty celkovej rádioaktivity v c_{\max} boli nižšie ako 2 % u ľudí (Ottaviani et al. 2016). To znamená rýchle vylučovanie.

8.1.2 Efflux limitujúci absorpciu

Vyššie popísaným multilumenálnym perfúznym katétrom sa potvrdil aj efflux metabolitov. Metabolity (–)-epikatechínu boli prítomné v príslušnom proximálnom segmente aj po podaní zlúčeniny do distálneho segmentu. To znamená efflux v inej časti čreva. Súhlasí vyššie množstvo metabolitov ako aglykónu a iný metabolický profil ako v perfundovanom segmente (Actis-Goretta et al. 2013). Rádioznačené metabolity boli taktiež prítomné v tráviacom trakte (Borges et al. 2016).

Po zavedení (–)-epikatechínu (10 – 50 $\mu\text{mol/l}$) na apikálnu stranu buniek Caco 2, nebol detekovaný na bazolaterálnej, ani jeho metabolity. Naopak po zavedení na bazolaterálnu, bol prítomný transport na apikálnu. To naznačuje veľmi nízku absorpciu v tenkom čreve, dôsledkom effluxu. Preto sa skúmali inhibítory effluxných transportérov. Inhibícia sa ukázala po pridaní MK-571, selektívneho kompetitívneho inhibítora MRP. Došlo k 50 % inhibícii effluxu (–)-epikatechínu. Zároveň sa objavil transport z apikálnej strany na bazolaterálnu s P_{app} $0,31 \pm 0,06 \times 10^{-6}$ cm/s. Inhibícia effluxu sulfátov bola takmer kompletná (Obr. 22). Súvisí to pravdepodobne s ich anionickou štruktúrou. Naopak verapamil, inhibítor P-glykoproteínu, nezmenil P_{app} (Vaidyanathan a Walle 2001).

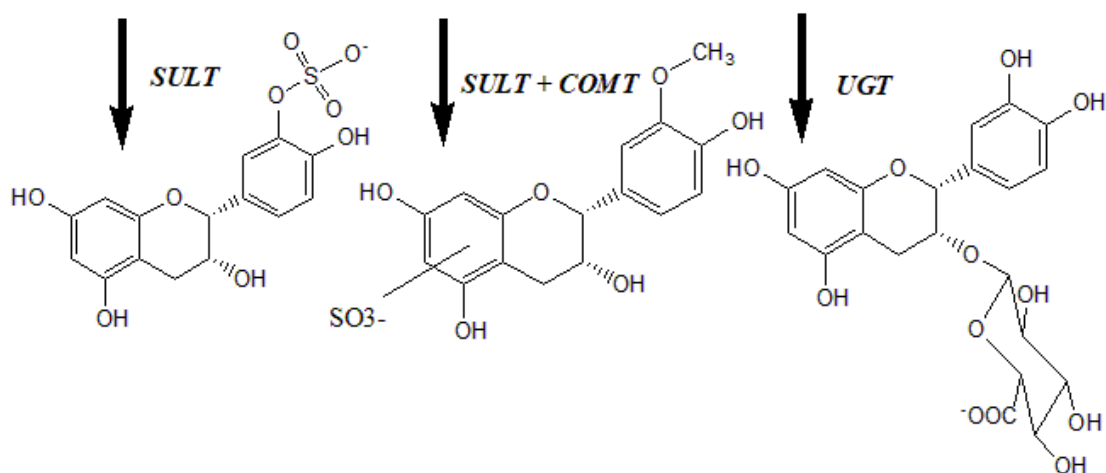


Obr. 22 Zmeny koeficientov zdanlivej permeability (P_{app}) po podaní 50 $\mu\text{mol/l}$ inhibítorov A/ bazolaterálne apikálny smer, B/ apikálne bazolaterálny smer. Kontrola je bez inhibítora. Prevzaté z: Vaidyanathan a Walle 2001

V inej štúdii sa P_{app} pre epikatechín v smere vylučovania znížil po podaní MK-571 z 3×10^{-6} cm/s na $0,5 \times 10^{-6}$ cm/s. To dokazuje takisto podstatnú inhibíciu effluxu epikatechínu. K takmer úplnej inhibícii došlo u jeho sulfátov (Zhang et al. 2004).

8.1.3 Metabolity epikatechínu detekované v plazme u človeka

U človeka sú identifikované v plazme tri základné skupiny metabolitov štruktúrne príbuzných epikatechínu (SREM): sulfáty, glukuronidy a metylované sulfáty (Barnett et al. 2015). Dnes je možné presnejšie určenie štruktúry. Väčšina výsledkov sa zhoduje na tom, že hlavným metabolitom je (-)-epikatechín-3'-*O*-glukuronid /(-)-epikatechín-3'- β -D-glukuronid/. Nasledujú (-)-epikatechín-3'-*O*-sulfát, 3'-*O*-metyl(-)-epikatechín-5-*O*-sulfát a 3'-*O*-metyl(-)-epikatechín-7-*O*-sulfát (Actis-Goretta et al. 2013, Ottaviani et al. 2012b, Ottaviani et al. 2016). Základné metabolity znázorňuje Obr. 23.

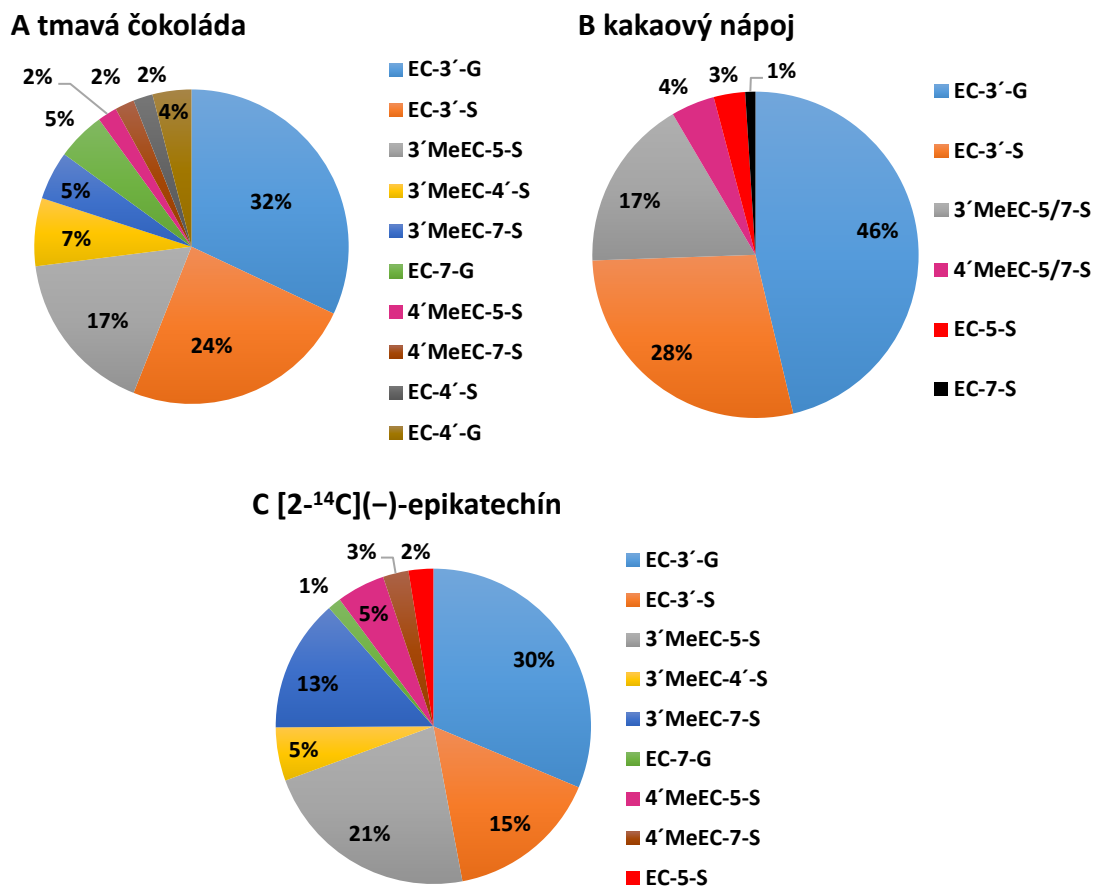


Obr. 23 Základné metabolity (-)-epikatechínu

Zľava (-)-epikatechín-3'-*O*-sulfát, 3'-*O*-metyl(-)-epikatechín-5/7-*O*-sulfát, (-)-epikatechín-3-*O*-glukuronid. Skratky: UGT, uridín-5'-difosfátglukuronyltransferáza; SULT, sulfotransferáza; COMT, katechol-*O*-metyltransferáza.

Prevzaté a upravené podľa: Ottaviani et al. 2012b

Vyskytovali sa početné limitácie a nezrovnalosti. 3'-*O*-metyl(-)-epikatechín-4'-*O*-sulfát bol v jednom prípade priradený medzi hlavné metabolity (Actis-Goretta et al. 2012). V iných prípadoch nebolo možné odlíšiť presné pozície, napríklad 5/7-*O*-sulfát (Ottaviani et al. 2012b). Kvôli tomu bola obmedzená kvantifikácia. Odlišnosti v zastúpení metabolitov v plazme po podaní 100 g 70 % čokolády (Actis-Goretta et al. 2012), kakaového nápoja so 138 mg (-)-epikatechínu (Ottaviani et al. 2012b), a 60 mg [2-¹⁴C](-)-epikatechínu (Ottaviani et al. 2016), znázorňuje Obr. 24.



Obr. 24 Rozdiely v zastúpení metabolitov (-)-epikatechínu v plazme u človeka po podaní rôznych substrátov

Percentuálne zastúpenie metabolitov: A/ za 24 hodín po podaní 70 % čokolády, B/ po 2 hodinách od podania kakaa, C/ po 1 hodine od podania [2-¹⁴C](-)-epikatechínu. Skratky: EC-3'-G, epikatechín-3'-O-glukuronid; EC-3'-S, epikatechín-3'-O-sulfát; 3'MeEC-5-S, 3'-O-metylepikatechín-5-O-sulfát; 3'MeEC-4'-S, 3'-O-metylepikatechín-4'-O-sulfát; 3'MeEC-7-S, 3'-O-metylepikatechín-7-O-sulfát; EC-7-G, epikatechín-7-O-glukuronid; 4'MeEC-5-S, 4'-O-metylepikatechín-5-O-sulfát; 4'MeEC-7-S, 4'-O-metylepikatechín-7-O-sulfát; EC-4'-S, epikatechín-4'-O-sulfát; EC-4'-G, epikatechín-4'-O-glukuronid; EC-5-S, epikatechín-5-O-sulfát; EC-7-S, epikatechín-7-O-sulfát.

Prevzaté a upravené podľa: A/ Actis-Goretta et al. 2012; B/ Ottaviani et al. 2012b; C/ Ottaviani et al. 2016

Na molekule epikatechínu je päť potenciálnych miest pre glukuronidáciu, prevažuje pozícia 3' (Actis-Goretta et al. 2012, Ottaviani et al. 2012b, Ottaviani et al. 2016). Nasledujú polohy 7 a 4'. Izoformy katalyzujúce glukuronidáciu sú pravdepodobne UGT1A1, UGT1A8 (hlavne v črevnej stene), a UGT1A9 (v pečeni) (Ziegler et al. 2015). Sulfatácia sa objavuje opäť v pozícii 3' a menej 5 a 7 (Ottaviani et al. 2012b).

Metylácia prebieha prevažne v kombinácii so sulfatáciou. Po podaní testovacieho nápoja s obsahom (-)-epikatechínu 1,8 mg/kg boli detekované sulfáty: 3'-*O*-metylované (c_{\max} 214 ± 26 nmol/l) a 4'-*O*-metylované (c_{\max} 51 ± 8 nmol/l). Prítomné boli v nižších koncentráciách (pod 20 nmol/l) aj metylované glukuronidy (Ottaviani et al. 2012b, Ottaviani et al. 2016). Predpokladá sa, že tieto premeny prebiehajú časovo až neskôr v pečeni a v obličkách (Harada et al. 1999). Predchádzajúce štúdie naopak zistili vyššiu kombináciu s glukuronidáciou. Zdôvodnením by mohol byť vstup do iných metabolických dráh, v závislosti na podávanej dávke. V prípade vysokej koncentrácie metylovaných glukuronidov boli podávané niekoľkonásobne vyššie dávky (19 mg/kg, čo je približne 10-krát viac od vyššie podaných 1,8 mg/kg), v porovnaní s bežným denným príjmom (Natsume et al. 2003).

T_{\max} hlavných SREM sa pohybuje v rozmedzí od 0,8 – 3,8 hodiny (Actis-Goretta et al. 2012, Actis-Goretta et al. 2013, Baba et al. 2000, Barnett et al. 2015, Ottaviani et al. 2012b, Ottaviani et al. 2016), priemerne okolo 2 hodín. Širšie rozmedzie môže byť spôsobené mnohými faktormi. Jedným z nich je pravdepodobne rôzne zloženie potravy. Zložky môžu ovplyvňovať uvoľňovanie epikatechínu, a tým rýchlosť vstrebávania (Ottaviani et al. 2016). Po podaní potravou je t_{\max} vždy o niečo vyšší ako u čistej zlúčeniny. $T_{1/2}$ SREM sa pohybuje v rozmedzí od 1 do 3 hodín po podaní čistej zlúčeniny (Barnett et al. 2015, Ottaviani et al. 2016).

V jednom prípade sa výrazne líšila kinetika (-)-epikatechín-7-*O*-glukuronidu od ostatných SREM, s hodnotami t_{\max} 12,8 ± 4,8 a $t_{1/2}$ 5,6 ± 1,1 v hodinách. Presná príčina nebola známa, autori predpokladali reabsorpciu, prípadne mikrobiálny metabolizmus až v hrubom čreve (Actis-Goretta et al. 2012).

5C-RFMs sa nachádzajú taktiež v plazme, kinetikou sa značne líšia od SREM (Ottaviani et al. 2016, Wiese et al. 2015). Najviac zastúpený je 5-(4'-hydroxyfenyl)- γ -valerolaktón-3'-*O*-sulfát. 5C-RFMs majú vyššie hodnoty t_{\max} . Pohybujú sa až okolo 6 hodín a viac. To svedčí o neskoršej tvorbe zlúčenín až v hrubom čreve. Takisto majú dlhší $t_{1/2}$, a to 3,1 – 7,6 hodiny (Ottaviani et al. 2016). Farmakokinetické parametre sú porovnané u dvoch hlavných SREM a RFMs po podaní rôznych látok v Tab. 7.

Tab. 7 Farmakokinetické parametre vybraných metabolitov (-)-epikatechínu

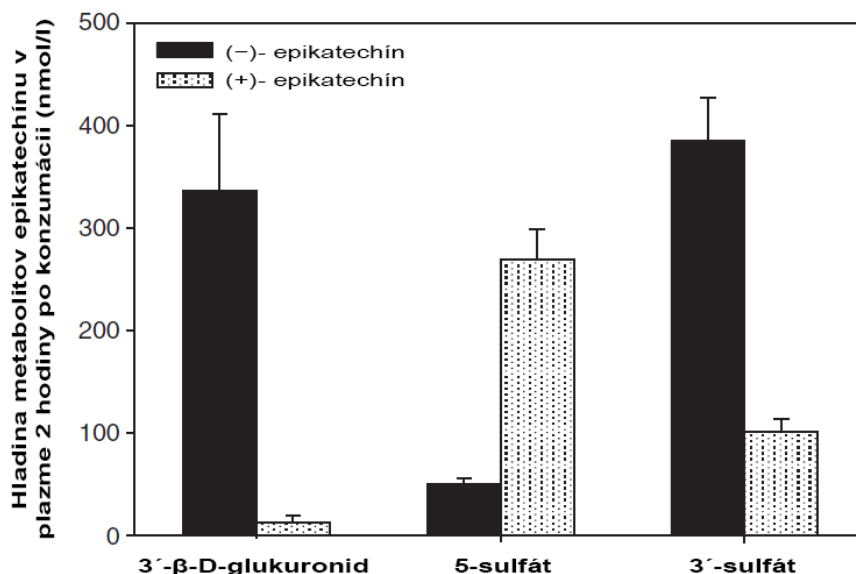
Počet ľudí	Podaná látka	Množstvo EC	c_{max} (nmol/l)	t_{max} (h)	AUC (nmol.h/l)	$t_{1/2}$ [h]	Zdroj
epikatechín-3'-O-glukuronid							
8	[2- ¹⁴ C](-)-epikatechín	60 mg/ 207 μmol*	359 ± 23	0,8 ± 0,1	1624 ± 332	2,0 ± 1,1	(1)
5	Nestlé Noir 70 % čokoláda	79 mg*	290 ± 49	3,2 ± 0,2	1276 ± 182	3,8 ± 1,0	(2)
10	testovací kakaový nápoj	138 mg**	589 ± 85	cca 2	–	–	(3)
epikatechín-3'-sulfát							
8	[2- ¹⁴ C](-)-epikatechín	60 mg/ 207 μmol*	191 ± 17	1,1 ± 0,1	633 ± 135	2,0 ± 0,3	(1)
5	Nestlé Noir 70 % čokoláda	79 mg*	233 ± 60	3,2 ± 0,2	954 ± 207	2,3 ± 0,8	(2)
10	testovací kakaový nápoj	138 mg**	331 ± 26	cca 2	–	–	(3)
5-(4' -hydroxyfenyl)-γ -valerolaktón-3' -sulfát							
8	[2- ¹⁴ C](-)-epikatechín	60 mg/ 207 μmol*	272 ± 56	6,4 ± 1,0	7595 ± 2684	6,3 ± 1,7	(1)

Vysvetlivky: c_{max} , maximálna koncentrácia v plazme; t_{max} , čas dosiahnutia maximálnej koncentrácie; AUC, plocha pod krivkou; $t_{1/2}$, polčas eliminácie; *, množstvo v podanej dávke; **, uvedené na 75 kg subjekt; testovací nápoj: pripravený z kakaového prášku, mlieka a výťažku z kaka, presné zloženie uvedené v zdroji.

Spracované podľa: (1) Ottaviani et al. 2016; (2) Actis-Goretta et al. 2012; (3) Ottaviani et al. 2012b

Zhrňujúc informácie o metabolickom profile (-)-epikatechínu uvedené vyššie, predpokladá sa, že ku glukuronidácii a sulfatácii dochádza v polohách 3', 4', 5, 7 a k metylácii v polohách 3' a 4'. Potenciálne je možné vytvorenie až 20 rôznych SREM.

Metabolizmus je závislý tiež na stereoizomérii. Porovnávali sa koncentrácie (-)-epikatechín-3'-O-glukuronidu po podaní (-)-epikatechínu a (+)-epikatechínu. V prvom prípade dosiahla c_{max} 336 ± 75 nmol/l, v druhom iba 13 ± 7 nmol/l. U (-)-epikatechínu bol dominantný 3'-O-sulfát (377 ± 49 nmol/l vs. 101 ± 13 nmol/l), naopak u (+)-epikatechínu prevažoval 5-O-sulfát. Dosahoval až päťkrát vyššiu c_{max} (270 ± 29 nmol/l vs. 50 ± 6 nmol/l). Názornú ukážku zobrazuje graf na Obr. 25 (Ottaviani et al. 2012b).



Obr. 25 Metabolizmus epikatechínu v závislosti na stereochémii

Hladiny metabolitov v plazme po podaní kakaového nápoja v dávke 1,5 mg/kg (-)-epikatechínu alebo (+)-epikatechínu.

Prevzaté a upravené podľa: Ottaviani et al. 2012b

8.1.4 Metabolity epikatechínu detekované v moči u človeka

Hlavné SREM detekované v moči majú podobnú štruktúru ako plazmatické. Dominantné sú: epikatechín-3'-*O*-glukuronid, epikatechín-3'-*O*-sulfát, 3'-*O*-metylepikatechín-5-*O*-sulfát a 3'-*O*-metylepikatechín-7-*O*-sulfát (Actis-Goretta et al. 2012, Ottaviani et al. 2016). 5-(4'-hydroxyfenyl)- γ -valerolaktón-3'-*O*-sulfát je hlavným 5C-RFMs. Najviac zastúpené 3/1C-RFMs sú: 3-(3'-hydroxyfenyl)-3-hydroxypropiónová kyselina, hippurová a 3'-hydroxyhippurová kyselina. Každá z týchto troch skupín metabolitov sa vylučuje močom v inom časovom rozmedzí (Ottaviani et al. 2016).

Zloženie v predchádzajúcich štúdiách sa líšilo, čo sa týka polohy metylácie. V jednej boli detekované ako hlavné SREM epikatechín-3'-*O*-glukuronid, 4'-*O*-metylepikatechín-3'-*O*-glukuronid a 4'-*O*-metylepikatechín-5/7-*O*-glukuronid (Natsume et al. 2003).

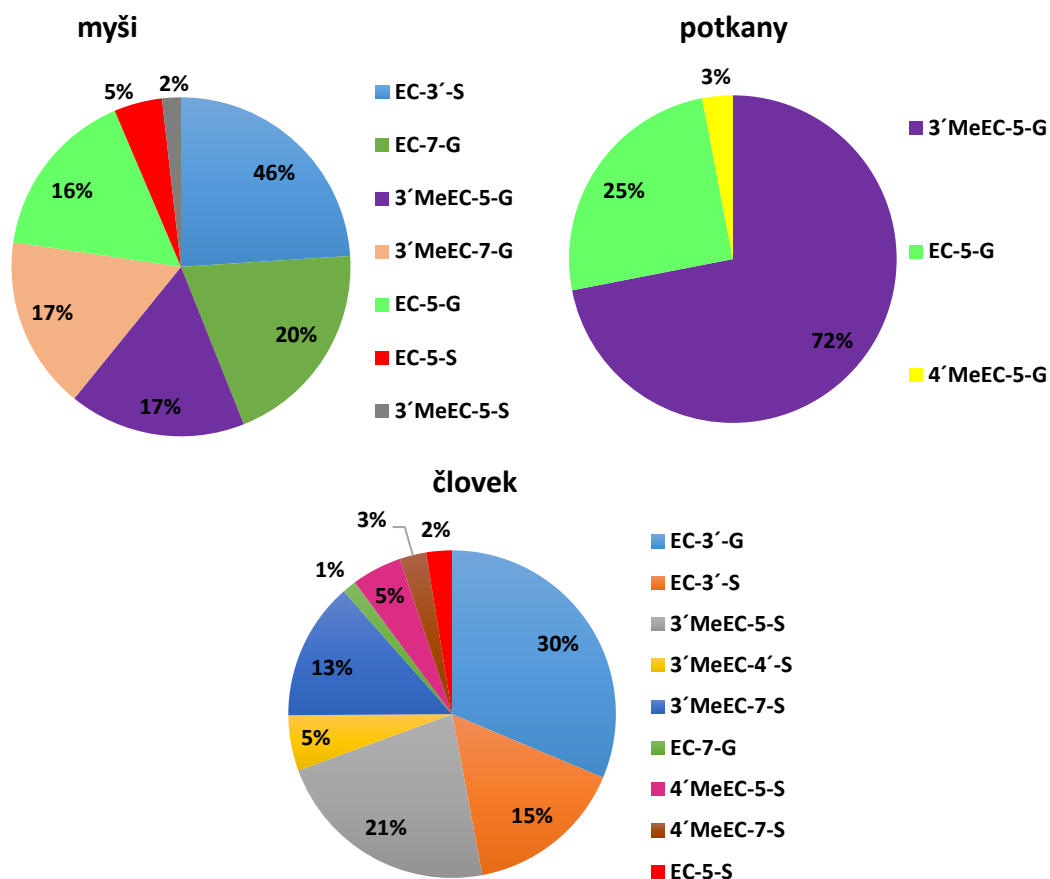
Ohľadom rozsahu renálneho vylučovania sa predpokladalo, že iba približne 21 % z celkového prijatého (-)-epikatechínu sa vylúči za 24 hodín (Actis-Goretta et al. 2012). Je potrebné si uvedomiť, že tento údaj nezahŕňa metabolity s rozštiepeným kruhom. Podobné množstvo 20 ± 2 % ($40,6 \pm 4,5$ μ mol) vylúčených SREM bolo zaznamenané z celkového prijatého množstva [2-¹⁴C](-)-epikatechínu (207 μ mol). V tomto prípade sa

naviac určila aj $42 \pm 5 \%$ ($87,4 \pm 9,6 \mu\text{mol}$) exkrécia 5C-RFMs a $28 \pm 3 \%$ ($57,7 \pm 6,9 \mu\text{mol}$) exkrécia 3/1C-RFMs. Celkovo vzrástla až cez 90 % (Ottaviani et al. 2016).

8.1.5 Medzidruhové rozdiely v metabolizme

Potvrdený je výskyt medzidruhových rozdielov v metabolizme (–)-epikatechínu. Hlavné biotransformačné cesty u potkanov sa nelíšia. Rozdiely sú prítomné v zastúpení hlavných metabolitov. V plazme prevládajú glukuronidy (Abd El Mohsen et al. 2002, Baba et al. 2001), prípadne glukuronid-sulfáty (Piskula a Terao 1998). Dominantnou je ale poloha 5 alebo 7 (Borges et al. 2016, Harada et al. 1999, Natsume et al. 2003, Ottaviani et al. 2016). Najviac zastúpené SREM v plazme sú epikatechín-5-*O*-glukuronid a 3'-*O*-metyl(–)-epikatechín-5-*O*-glukuronid (Harada et al. 1999, Ottaviani et al. 2016). Namerané koncentrácie sulfátov boli výrazne nižšie, v niektorých prípadoch neboli vôbec detekované (Abd El Mohsen et al. 2002, Harada et al. 1999). Príčinou mohla byť nedostupnosť štandardov alebo limitácie metódy hydrolýzy. Ďalej predpokladáme, že za to môžu vysoké podané dávky (100 mg/kg), kedy mohla byť sulfatácia značne obmedzená. Ak sa vyskytovali, tak hlavne 3'-*O*-metylované, na rozdiel od nemetylovaných glukuronidov (Baba et al. 2001). Metylačné reakcie sú najpomalšie, ale produkty zostávajú najdlhšie v krvnom obeh. Po 8 hodinách od podania boli hlavnými metabolitmi v plazme (75 % z celkových detekovaných metabolitov) práve metylované formy (Piskula a Terao 1998). Metylácia hydroxylových skupín prebieha v polohe 3' alebo 4' (Abd El Mohsen et al. 2002).

Ottaviani et al. (2016) dokázali, že žiadny z hlavných SREM v plazme u ľudí, sa nevyskytoval u potkanov. U myší je celkové zastúpenie o niečo bližšie ľuďom. Medzidruhové rozdiely by sa mali brať do úvahy pri kritickom hodnotení výsledkov štúdií na zvieratách. Podiel konkrétnych metabolitov (–)-epikatechínu u ľudí, potkanov a myší zobrazujú kruhové grafy na Obr. 26.



Obr. 26 Druhovo závislé rozdiely v metabolizme [2-14C](-)-epikatechínu

Kruhové diagramy znázorňujúce relatívne množstvo jednotlivých SREM v plazme po 30 minútach u potkanov alebo myši, a po 60 minútach u ľudí. Potkany: 3'MeEC-5-G, 3'-O-metylepikatechín-5-O-glukuronid; EC-5-G, epikatechín-5-O-glukuronid; 4'MeEC-5-G, 4'-O-metylepikatechín-5-O-glukuronid. Človek: EC-3'-G, epikatechín-3'-O-glukuronid; EC-3'-S, epikatechín-3'-O-sulfát; 3'MeEC-5-S, 3'-O-metylepikatechín-5-O-sulfát; 3'MeEC-4'-S, 3'-O-metylepikatechín-4'-O-sulfát; 3'MeEC-7-S, 3'-O-metylepikatechín-7-O-sulfát; EC-7-G, epikatechín-7-O-glukuronid; 4'MeEC-5-S, 4'-O-metylepikatechín-5-O-sulfát; 4'MeEC-7-S, 4'-O-metylepikatechín-7-O-sulfát; EC-5-S, epikatechín-5-O-sulfát. Myši: EC-3'-S, epikatechín-3'-O-sulfát; EC-7-G, epikatechín-7-O-glukuronid; 3'MeEC-5-G, 3'-O-metylepikatechín-5-O-glukuronid; 3'MeEC-7-G, 3'-O-metylepikatechín-7-O-glukuronid; EC-5-G, epikatechín-5-O-glukuronid; EC-5-S, epikatechín-5-O-sulfát; 3'MeEC-5-S, 3'-O-metylepikatechín-5-O-sulfát.

Prevzaté a upravené podľa: Ottaviani et al. 2016

Novšie dostupné výsledky dokázali aj prítomnosť štiepných produktov. V plazme boli prítomné až po 6 hodinách. Najvyššie zastúpenie mali: 5-(3'-hydroxyfenyl)- γ -hydroxyvalérová kyselina-4'-O-glukuronid a hippurová kyselina (Borges et al. 2016).

V niektorých prípadoch bolo zložité určiť zastúpenie metabolitov, pretože podliehali viacerým konjugačným premenám. Príkladom sú identifikované metyl-glukuronid-

sulfáty. Pri kvantifikácii, kedy bolo možné určiť len podiel glukuronidov, sulfátov a metylovaných zlúčenín, potom dochádzalo k chybám. Jedna zlúčenina mohla byť zaradená k viacerým skupinám. Výsledky neboli jednoznačné (Piskula a Terao 1998).

Nekonjugované formy sú prítomné v nízkych plazmatických koncentráciách, rovnako ako u ľudí (Harada et al. 1999, Piskula a Terao 1998). Koncentrácie v moči sú výrazne vyššie. Dôvodom je pravdepodobná dekonjugácia v obličkách pred vylúčením. Hlavným SREM v moči je 3'-*O*-metyl(-)-epikatechín. Ďalej sa objavuje aj voľný (-)-epikatechín, (-)-epikatechín-5-*O*-glukuronid a 3'-*O*-metyl(-)-epikatechín-5-*O*-glukuronid (Borges et al. 2016). V porovnaní s týmito výsledkami, Natsume et al. (2003) zistili glukuronidáciu prebiehajúcu len v polohe 7.

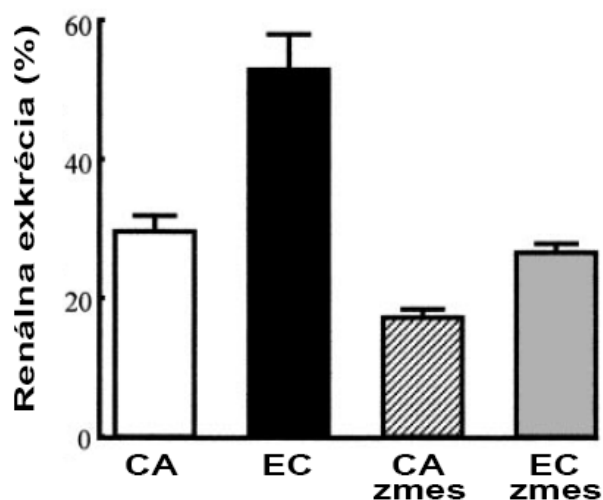
SREM sa vylúčia takmer všetky do 12 hodín, 3'-*O*-metyl(-)-epikatechín bol jediný identifikovaný ešte po 12 – 24 hodinách (Borges et al. 2016). Močom sa vylúčilo okolo 36 % (Tsang et al. 2005).

Okrem toho sú prítomné v moči RFMs: 5-(3',4'-dihydroxyfenyl)- γ -valerolaktón, 5-(3'-hydroxyfenyl)- γ -hydroxyvalérová kyselina-4'-*O*-glukuronid, hippurová kyselina a 4'-hydroxybenzoová kyselina-3'-*O*-sulfát. Z metylovaných foriem sa podarilo identifikovať 5-(3'-metoxyfenyl)- γ -hydroxyvalérová kyselina-4'-*O*-glukuronid (Borges et al. 2016).

Po podaní rádioznačeného (-)-epikatechínu potkanom (27 samčiekov kmeňa Sprague-Dawley) žalúdočnou sondou, sa analýzou HPLC v spojení s hmotnostnou spektrometriou (MS) podarilo identifikovať až 19 metabolitov v telesných tekutinách a v zažívacom trakte za 72 hodín. Najdôležitejšie závery po zhrnutí výsledkov boli nasledovné: absencia glukuronidov hlavných SREM v slepom čreve, na rozdiel od jejuna/ilea, by mohla byť spôsobená vstrebaním glukuronidov alebo rozštiepením bakteriálnymi enzýmami. Tieto dva procesy mohli zapríčiniť aj neprítomnosť metabolitov II. fázy metabolizmu v stolici, ktoré boli prítomné v hrubom čreve. RFMs boli už v jejune/ileu v malých množstvách. To opäť potvrdzuje prítomnosť effluxu, ale významne zastúpené sú v hrubom čreve. Štúdia sa líši od predchádzajúcich podanou dávkou, ktorá korešponduje s 1,13 mg/kg u 70 kg človeka. To je približne odhadovaný denný príjem flavanolov. Pri starších výskumoch sa dávky vymykali rozmedziu, čo mohlo viesť k rozdielnym a skresleným výsledkom (Borges et al. 2016).

8.2 Katechín

Druhým významným flavanolom je (+)-katechín. Farmakokinetických štúdií bolo menej, väčšina prebiehala na potkanoch. Je rovnako rýchlo vstrebateľný, avšak rozsah absorpcie (-)-epikatechínu je vyšší ako u (+)-katechínu. Táto skutočnosť bola skúmaná s cieľom porovnania farmakokinetiky *in vivo* u potkanov. Plazmatické koncentrácie (-)-epikatechínu a jeho metabolitov boli v každom prípade vyššie (Baba et al. 2001, Harada et al. 1999). Podľa niektorých autorov by možným vysvetlením mohla byť aj vyššia citlivosť ku glukuronidácii (Harada et al. 1999). Zároveň, pri podaní spoločne je možná prítomnosť kompetície. Prišlo sa na to rozdelením 20 potkanov (kmeň Sprague-Dawley) do štyroch skupín, ktorým sa podával samostatne (-)-epikatechín (17,2 mmol/l) alebo (+)-katechín (17,2 mmol/l), ich zmes (1:1, spolu 34,5 mmol/l) a poslednej porovnávacej skupine deionizovaná voda (10 ml/kg). Po detekcii vzoriek plazmy prostredníctvom HPLC-MS sa zistilo, že u jednotlivých zlúčenín je vstrebanie menej efektívne pri podaní v kombinácii, ako pri podaní jednotlivo. Súhlasí tiež renálna exkrécia (Obr. 27), u oboch zlúčenín nižšia pri súčasnom podaní (Baba et al. 2001).



Obr. 27 Celková renálna exkrécia metabolitov (+)-katechínu a (-)-epikatechínu u potkanov
 Za 24 hodín po podaní (+)-katechínu (CA, biely stĺpec), (-)-epikatechínu (EC, čierny stĺpec)
 a ich zmesi: (+)-katechín v zmesi (CA zmes, šráfovaný stĺpec), (-)-epikatechín v zmesi (EC
 zmes, sivý stĺpec).

Prevzaté a upravené podľa: Baba et al. 2001

Z celkového podaného množstva sa močom vylúči okolo 27 % (Tsang et al. 2005). Súhlasia Gonthier et al. (2003) s podobným výsledkom približne 25,7 %. V tejto štúdii sa

rátalo aj s mikrobiálnymi rozkladnými produktami detekovanými v moči. Tie tvorili ďalších cca 10,6 % z podaného množstva. Tým sa celkovo vylučovanie blíži ku 40 %.

Rozdiely vo farmakokinetike oproti (–)-epikatechínu vypovedajú o prítomnosti vplyvu stereoizomérie. Plazmatické koncentrácie voľnej zlúčeniny sú rovnako nízke. Po konzumácii 120 ml červeného vína s obsahom 34 ± 1 mg (+)-katechínu sa po 1 hodine vyskytovalo v nekonjugovanej forme menej ako 2 % z celkového množstva v plazme (Donovan et al. 1999). Prítomná bola aj metylovaná voľná forma (Baba et al. 2001). Z metabolitov u potkanov prevažuje v plazme (+)-katechín-5-*O*-glukuronid. Naopak afinita k enzýmom COMT a SULT je pravdepodobne nižšia (Baba et al. 2001, Harada et al. 1999). T_{\max} katechínu a jeho metabolitov sa pohybuje okolo 1 – 2 hodín (Donovan et al. 1999, Harada et al. 1999).

8.3 Galáty

Hlavným polyfenolom v zelenom čaji je epigalokatechíngalát (Mulder et al. 2005) a preto aj údaje o farmakokinetike galátov sú dostupné prevažne po podaní čajových extraktov, Polyfenonu E alebo samotného epigalokatechíngalátu. Týmto spôsobom je možné katechíny vzájomne porovnať za rovnakých podmienok. T_{\max} čajových katechínov sa pohybuje priemerne okolo 1 – 2 hodín (Lee et al. 2002).

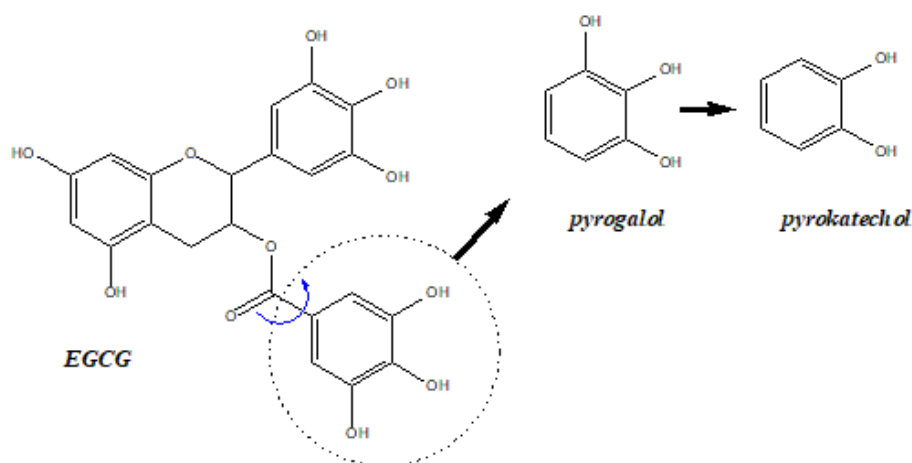
Významnou odlišnosťou je výskyt galátov v plazme v prevažne nekonjugovanej voľnej forme, na rozdiel od negaloylovaných zlúčenín (Chow et al. 2003, Chow et al. 2005, Lee et al. 2002). Voľná forma tvorila až cca 92 %, na základe vypočítaných pomerov AUC (Chow et al. 2003). Po podaní 400 ml zeleného čaju s obsahom 400 μ mol flavanolov sa detekoval epigalokatechíngalát v plazme ako jediný nekonjugovaný flavanol (Del Rio et al. 2010). Je teda možné, že metabolizmus prebieha v menšej miere.

Galáty sú estery absorbujúce sa v nedisociovej neionizovanej forme (Vaidyanathan a Walle 2003). V tenkom čreve sa absorbujú menej ako negaloylované formy. Po podaní 200 mg Polyfenonu E priemerne $27 \pm 2\%$ z prijatého množstva (–)-epikatechínu a (–)-epigalokatechínu bolo detekovaných po 24 hodinách v ileálnej tekutine ileostomikov. Až $59 \pm 3\%$ sa podarilo detekovať (–)-epigalokatechíngalátu a (–)-epikatechíngalátu. To znamená, že toto množstvo prechádza do hrubého čreva a môže byť degradované bakteriálne (Auger et al. 2008). V t_{\max} 1,3 – 1,6 hodiny, hodnoty c_{\max} epigalokatechíngalátu, priemerne 77,9 ng/ml, sú po podaní zeleného čaju (20 mg/kg)

nižšie, ako u epikatechínu (c_{\max} 124,0 ng/ml) a epigalokatechínu (c_{\max} 223,4 ng/ml). Aj napriek tomu, že obsah epigalokatechíngalátu v čaji je vyšší. Len 0,16 % z prijatého množstva sa objavilo v čase t_{\max} v plazme. Po podaní čistej zlúčeniny (2 mg/kg) sa hodnoty veľmi nelíšili. $T_{1/2}$ je naopak vyšší, až cez 3 hodiny (Lee et al. 2002).

Naviac môže dochádzať, aj keď v malom rozsahu, k metylácii hydroxylov galátovej skupiny. V plazme a v moči, po podaní zeleného čaju (20 mg/kg) bol identifikovaný okrem nekonjugovaného epigalokatechíngalátu (c_{\max} 145,4 ± 31,6 nmol/l), aj 4',4''-*O*-dimetylepigalokatechíngalát (c_{\max} 20,5 ± 7,7 nmol/l). U oboch prevažovali voľné formy. $T_{1/2}$ tohto derivátu bol viac ako 4 hodiny a vylučoval sa aj v moči (140,3 ± 48,6 µg po 24 hodinách), dokonca až 5-krát viac ako epigalokatechíngalát. Aj napriek tomu jeho vylučovanie močom neprevyšovalo 0,1 % z podaného množstva. Po podaní samotného epigalokatechíngalátu (2 mg/kg) boli výsledky podobné (Meng et al. 2002). V moči sú prítomné galáty v minimálnych množstvách, prípadne nie sú detekované vôbec. Pravdepodobne sa z pečene žľou vrátia do čreva a vylúčia stolicou alebo sú rozkladané v hrubom čreve (Auger et al. 2008, Lee et al. 2002, Stalmach et al. 2010).

Štiepenie bakteriálnymi enzýmami je podobné ako u (epi)galokatechínov, líši sa odštiepenie 3-*O*-galátu. Pravdepodobne z neho vzniká pyrogalol a dehydroxyláciou pyrokatechol, vid' Obr. 28. Obidva produkty boli detekované aj v moči, ale len v minimálnych koncentráciách (Roowi et al. 2010).

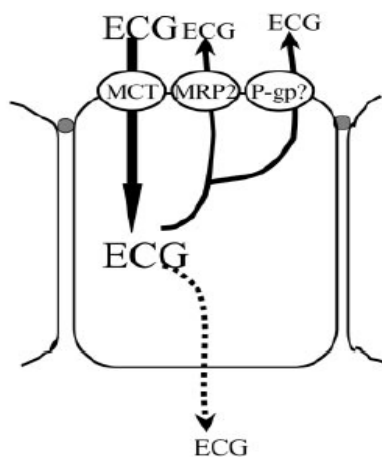


Obr. 28 Štiepenie epigalokatechíngalátu (EGCG) bakteriálnou mikroflórou
Prevzaté a upravené podľa: Roowi et al. 2010

U galátov dochádza v menšej miere k spätnému vylučovaniu metabolitov effluxnými pumpami ako u negaloylovaných zlúčenín. Jednak sú menej metabolizované, ale možno majú aj nižšiu afinitu k effluxným transportérom. Dokazuje to ich nízky P_{app} v smere

vyučovania (Zhang et al. 2004). Keď porovnáme percentuálny podiel metabolitov konkrétneho flavanolu detekovaný v lumen čreva, z množstva jeho orálneho príjmu, klesá v poradí: katechín/epikatechín > galokatechín/epigalokatechín > epigalokatechíngalát/epikatechíngalát (Stalmach et al. 2010, Zhang et al. 2004).

Vyššie bol spomenutý ako možná príčina nižší prienik do buniek, a tým metabolizácia. Avšak (-)-epikatechíngalát a (-)-epigalokatechíngalát sa akumulujú vnútri Caco 2 buniek. Aj keď transport na bazolaterálnu stranu bunky je nízky. U epikatechíngalátu najskôr vzrástol príjem do buniek a dosiahol rovnováhu po približne 60 minútach. Dej je pravdepodobne saturabilný a závislý časovo. So znižujúcim sa pH od 7,4 do 5,0 sa zvýšila akumulácia 2-krát. Takisto závisí aj na podanej koncentrácii. Od 50 do 200 $\mu\text{mol/l}$ vzrástol P_{app} v smere vstrebávania z 0,32 na $0,78 \times 10^{-6}$ cm/s. Po podaní 50 $\mu\text{mol/l}$ MK-571 sa tieto hodnoty P_{app} zmenili na 0,47 a $1,64 \times 10^{-6}$ cm/s. Zároveň sa znížil efflux. Zodpovedný za efflux je okrem MRP 2, MRP 1 aj P-glykoproteín. Prienik do buniek je možný aj vďaka protónovému kotransportéru MCT, čo bolo vzhľadom na štruktúru nečakané. Po podaní inhibítorov MCT floretínu a benzoovej kyseliny príjem epikatechíngalátu do bunky poklesol (Vaidyanathan a Walle 2003). Predpokladané deje prebiehajúce na modeli Caco 2 vidieť na Obr. 29. V týchto štúdiách by za prítomnosť nízkej absorpcie mohla byť zodpovedná menšia podávaná dávka čajových katechínov (50 $\mu\text{mol/l}$) alebo citlivosť metódy. Treba brať do úvahy aj limitáciu *in vitro* podmienok, napríklad prípadné rozdiely v expresii transportných proteínov.



Obr. 29 Model absorpcie epikatechíngalátu v enterocytoch

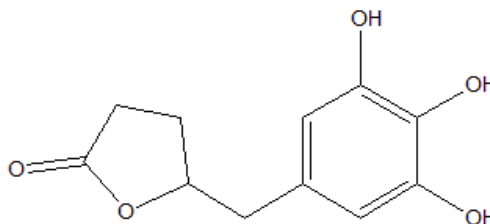
Vysvetlenie skratiek: MCT, monokarboxylátový transportér; MRP2, multidrug resistance-associated protein 2; P-gp, P-glykoproteín; ECG, epikatechíngalát.

Prevzaté z: Vaidyanathan a Walle 2003

8.4 (Epi)galokatechíny

Tieto polárnejšie zlúčeniny majú o niečo nižšiu absorpciu ako (epi)katechíny, rovnako aj renálne vylučovanie (Auger et al. 2008). Po podaní zeleného čaju ileostomikom renálne vylučovanie metabolitov (epi)katechínu bolo 27 ± 2 % a (epi)galokatechínu iba 8 ± 1 %. Percentuálne hodnoty vyjadrujú podiel z podaného množstva zlúčenín (Stalmach et al. 2010). Podobne sa udáva 20,0 % a 9,7 % v inej štúdií. V organizme sa vyskytujú hlavne vo forme metabolitov, čo je naopak odlišné od galátov (Borges et al. 2013).

V hrubom čreve prebieha štiepenie bakteriálnou mikroflórou, špecifickým metabolitom (–)-epigalokatechínu je 5-(3',4',5'-trihydroxyfenyl)- γ -valerolaktón (Obr. 30). Po inkubácii so vzorkami stolice tvoril až 41 % z prijatého (–)-epigalokatechínu (Roowi et al. 2010). Vyskytuje sa v plazme aj v moči, z neho vznikajú štiepením fenolické kyseliny, napríklad kyselina 4'-hydroxyfenyloctová (Lee et al. 2002, Roowi et al. 2010).



Obr. 30 Štruktúra 5-(3',4',5'-trihydroxyfenyl)- γ -valerolaktón
Štruktúra vytvorená podľa: Roowi et al. 2010

8.5 Proantokyanidíny

Farmakokinetika sa líši od monomérov. Dôvodom je predovšetkým zložitá štruktúra a nedostupnosť štandardov (Déprez et al. 2000). Napriec štúdiami som sa stretla s konkrétne definovanými prokyanidínmi, ktorých štruktúry a skratky sú uvedené v Tab. 1 (podkapitola 3.2). Viaceré výskumy zistili vplyv na prevenciu rakoviny a kardiovaskulárnych ochorení po podaní potravy bohatej na PA (Santos-Buelga a Scalbert 2000). K pôsobeniu sa predpokladá prekonanie črevnej bariéry. V nasledujúcom texte sú popísané najviac diskutované oblasti ich osudu v organizme.

8.5.1 Absorpcia a metabolizmus natívnych foriem

Čo sa týka absorpcie samotných PA, niektoré výskumné skupiny tvrdia, že k nej nedochádza (Borges et al. 2013, Gonthier et al. 2003). Vo vzorkách plazmy ani v moči

neboli prítomné, ani pri pomerne vysokých dávkach, napríklad 20 mg PB3 (Donovan et al. 2002).

Iné výskumy tento predpoklad vyvrátili. Dokázala sa čiastočná absorpcia oligomérnych foriem u potkanov, konkrétne: dimérne PB1, PB2, PB3, PB4, trimérny PC2 (Baba et al. 2002, Tsang et al. 2005). *In vitro* na seróznej strane enterocytov u potkanov, sa podarilo identifikovať malé množstvo dimérov PB2 a PB5, nemetylovaných aj metylovaných (Spencer et al. 2001). *In situ* perfúzna štúdia tenkého čreva potkanov navyše dokázala čiastočnú absorpciu PA1 a PA2, ktorá bola vyššia ako u PB2 (pod 10 nmol/l). Predstavovala 5 – 10 % absorpcie (–)-EC. Neboli identifikované ale žiadne metabolity PA, na rozdiel od predchádzajúceho výskumu. Súčasne sa potvrdila neprítomnosť absorpcie a depolymerizácie tetramérov a trimérov (Appeldoorn et al. 2009b).

Niektoré dimérne formy boli aj v ľudskej plazme. Podarilo sa detekovať PB2 po podaní kakaa (0,375 g kakaa/kg) bohatého na PA. V priemere požili 26,4 g kakaa s obsahom 323 mg monomérov a 256 mg dimérov. Už po 30 minútach bol detekovaný PB2 v koncentrácii 16 ± 5 nmol/l. Po 2 hodinách dosiahol c_{\max} 41 ± 4 nmol/l. Koncentrácie boli oveľa nižšie ako u zároveň detekovaného (–)-epikatechínu s c_{\max} $5,92 \pm 0,60$ $\mu\text{mol/l}$ a (+)-katechínu s c_{\max} $0,16 \pm 0,03$ $\mu\text{mol/l}$ (Holt et al. 2002). Nekonjugovaný PB2 neskôr v koncentrácii $4,0 \pm 0,6$ nmol/l detekovali po 2 hodinách aj Ottaviani et al. (2012b), po podaní nápoja s obsahom dimérov 1,8 mg/kg. Koncentrácia sa blížila limitu detekcie.

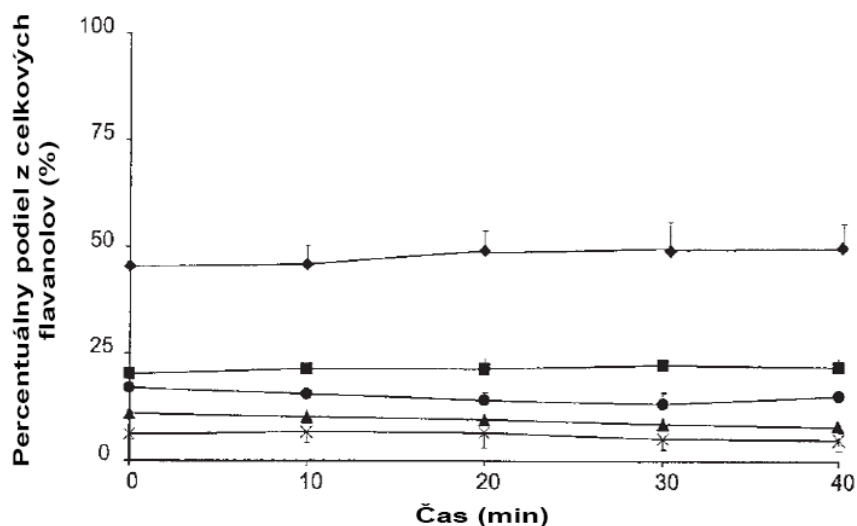
Ďalej sa objavil v plazme PB1 po podaní až 2 g výt'azku z hroznových jadriek obsahujúceho 18 mg PB1 (Sano et al. 2003) a po podaní PB1 v množstve 1 mg/kg (Wiese et al. 2015). Koncentrácia PB1 po 2 hodinách bola nízka, a to $10,6 \pm 2,5$ nmol/l (Sano et al. 2003). V žiadnom vyššie uvedenom prípade nedochádzalo ku glukuronidácii ani sulfatácii PA. Polymerizácia je teda limitáciou konjugácie. V niektorých štúdiách došlo k detekcii metylovaných foriem, okolo 12 % celkového PB1 v plazme, ktorého c_{\max} bola len $1,6 \pm 0,3$ ng/ml po 2 hodinách a AUC za 4 hodiny 10 ± 5 ng.h/ml. Rovnako renálne vylučovanie bolo nízke, $0,07 \pm 0,02$ % pohltenej dávky. Monoméry neboli detekované v plazme ani v moči (Wiese et al. 2015).

8.5.2 Depolymerizácia na monoméry

Staršie štúdie u potkanov predpokladali, že dochádza k čiastočnej depolymerizácii PA na následne vstrebateľné monoméry (Baba et al. 2002, Spencer et al. 2001). Po podaní 50

mg/kg čistého PB2 rozpusteného v deionizovanej vode (5 mg/ml), boli detekované v plazme a moči PB2, čistý nekonjugovaný (–)-epikatechín a 3'-*O*-metyl(–)-epikatechín. T_{max} sa pohyboval od 0,5 do 1 hodiny. Renálna exkrécia (–)-epikatechínu a 3'-*O*-metyl(–)-epikatechínu (počas 18 hodín) bola veľmi nízka, spolu len 0,14 % z podanej dávky. 0,34 % sa vylúčilo v moči PB2. Predpokladala sa čiastočná degradácia PB2 na monoméry, vstrebanie, ich metabolizmus a vylúčenie (Baba et al. 2002). Predtým po podaní PB2 a PB5 *in vitro* perfúznou metódou na izolovanom čreve potkanov, bol zistený vysoký podiel voľného nekonjugovaného monoméru (–)-epikatechínu. Cesta štiepenia ale nebola objasnená (Spencer et al. 2001).

Ďalšie výskumy u potkanov depolymerizáciu zamietli. Monoméry v týchto prípadoch *in vivo* neboli detekovateľné. Podával sa extrakt z hroznových jadierok, ale aj samotné diméry, triméry či polyméry (Donovan et al. 2002, Gonthier et al. 2003, Tsang et al. 2005). Stabilita pri prechode žalúdkom sa potvrdila aj u ľudí, po požití 500 ml kakaa s obsahom prokyanidínov 733 mg a monomérnych flavanolov 351 mg. V tomto prípade sa skúmali vzorky žalúdočného obsahu získané nazogastrickou trubicou, odoberané každých 10 minút, po dobu 50 – 60 minút. Neboli pozorované zmeny v koncentráciách, ani v pomeroch oligomérov a monomérov, vid' Obr. 31 (Rios et al. 2002).



Obr. 31 Graf závislosti percentuálneho podielu prokyanidínov a monomérov z celkového množstva flavanolov v žalúdku, na čase, po podaní kakaového nápoja

× pentaméry, ▲ tetraméry, ● triméry, ■ diméry, ♦ monoméry.

Prevzaté a upravené podľa: Rios et al. 2002

K rovnakému záveru sa dospelo po podaní výťažkov z kakaa s rôznymi druhmi flavanolov, vid' Tab. 8. Koncentrácie metabolitov sa po podaní monomérov spolu s prokyanidínmi, a samotných monomérov, takmer nelíšili. Nedochoádzalo

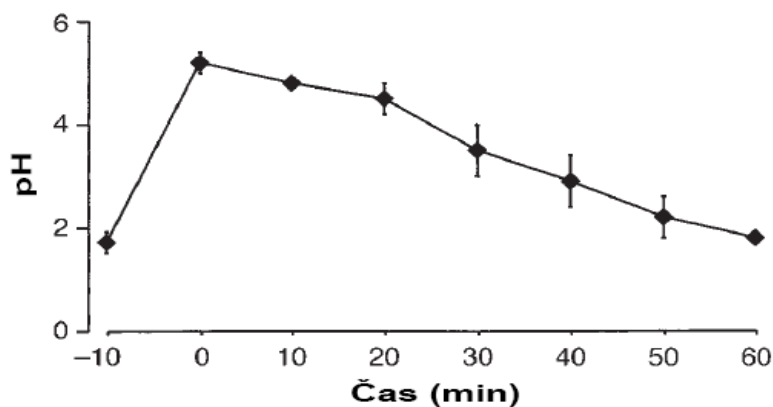
k depolymerizácii. Minimálne detekované množstvá po podaní prokyanidínov, odpovedali zbytkovému obsahu monomérov v nápoji. Ani v moči nedošlo k nárastu koncentrácií monomérov, ani ich metabolitov, počas 24 hodín. Štúdia zamietla depolymerizáciu v žalúdku, ale aj v hrubom čreve (Ottaviani et al. 2012a).

Tab. 8 Hodnoty c_{max} a AUC_{0-4} metabolitov flavanолоv

Podané flavanoly	C_{max} (nmol/l)	AUC_{0-4} (nmol.4h/l)
D1	880 ± 73	2472 ± 187
D1 – 10	863 ± 77	2365 ± 206
D2 – 10	80 ± 23	244 ± 23

D1, monoméry; D1 – 10, monoméry a prokyanidíny s polymeračným stupňom 2-10; D2 – 10, prokyanidíny s polymeračným stupňom 2 – 10; AUC_{0-4} , plocha pod krivkou po 4 hodinách; c_{max} , maximálna koncentrácia v plazme.
Prevzaté a upravené podľa: Ottaviani et al. 2012a

Depolymerizácia v žalúdku je nepravdepodobná *in vivo*. Nezrovnalosti by mohli byť spôsobené rozdielnym pH v žalúdku pri *in vitro* výskumoch, kedy je veľmi nízke (pH 2). Graf na Obr. 32 bol vybratý ako ukážka meniaceho sa pH po požití kaka. Z počiatočných pH $1,9 \pm 0,2$ vzrástlo na pH $5,4 \pm 0,2$. Potom postupne s vyprázdňovaním žalúdka klesalo. Trvalo to 50 – 60 minút (Rios et al. 2002). K hydrolyze teda za reálnych podmienok pri vyššom pH nedochádza.



Obr. 32 Graf závislosti pH žalúdka na čase, po podaní 500 ml kakaového nápoja s obsahom 37,5 g kakaového prášku
Prevzaté a upravené podľa: Rios et al. 2002

8.5.3 Bakteriálny rozklad na fenolické kyseliny

Vstrebateľnosť v tenkom čreve je minimálna. Väčšina PA sa dostane do hrubého čreva. Tam dochádza k bakteriálnemu rozkladu na nízkomolekulárne zlúčeniny. Potenciálne cesty štiepenia zobrazuje Obr. 19 (podkapitola 6.2). Fenolické zlúčeniny by mohli byť zodpovedné za účinky na organizmus (Gonthier et al. 2003). Rozkladné metabolity sa však vo väčšine štúdií neskúmali, a tak výsledky neboli kompletne (Tsang et al. 2005).

Mikrobiálny pôvod sa potvrdil za anaerobných podmienok *in vitro* (Appeldoorn et al. 2009b, Déprez et al. 2000, Ou et al. 2014). Najskôr pri skúmaní ^{14}C rádioznačených PA (priemerný polymeračný stupeň 6) z vrbových výhonkov, po 48-hodinovej inkubácii s izolovanou ľudskou mikroflórou hrubého čreva. Aromatické kyseliny sa líšili dĺžkou alifatického reťazca a hydroxyláciou. Hlavným zástupcom bola 3-(3'-hydroxyfenyl)propiónová kyselina. Podarilo sa detekovať aj fenyloctové a benzoové kyseliny (Déprez et al. 2000). Podobné rozkladné produkty sa zaznamenali aj v novších štúdiách. Po 24-hodinovej inkubácii predstavovali tieto metabolity 56,9 % (-)–EC; 54,2 % (+)–CA; 38,3 % PB2; 27,7 % PA2; 21,3 % prokyanidínov z jablák (hlavne typ B) a 20,0 % prokyanidínov z brusníc (hlavne typ A). Typ A bol odolnejší, pravdepodobne vďaka stabilnejšej štruktúre. Potvrdil sa aj nárast odolnosti s rastúcou molekulovou hmotnosťou. Najviac zastúpené boli: kyselina benzoová, 2-fenyloctová, 3-fenylpropiónová. Okrem nich 5-(3'-hydroxyfenyl)- γ -valerolaktón a 5-(3',4'-dihydroxyfenyl)- γ -valerolaktón patrili medzi hlavné metabolity u (+)-katechínu, (-)-epikatechínu a PB2, nie u PA2 a PA z brusníc. Následne boli pravdepodobne rozštiepené na fenylyalérové kyseliny. 3'-hydroxyfenyloctová, 4'-hydroxyfenyloctová a 3-(3'-hydroxyfenyl)propiónová kyselina sa objavovali menej (Ou et al. 2014).

Podobná situácia bola u potkanov (Gonthier et al. 2003) aj u ľudí (Ottaviani et al. 2012a, Rios et al. 2003, Ward et al. 2004, Wiese et al. 2015). Po podaní (+)-katechínu, diméru PB3, trimérneho PC2 a zmesi polymérov potkanom, klesala renálna exkrécia rozkladných metabolitov s rastúcim polymeračným stupňom. Tab. 9 zhrňuje túto závislosť a rozdiely v zastúpení kyselín.

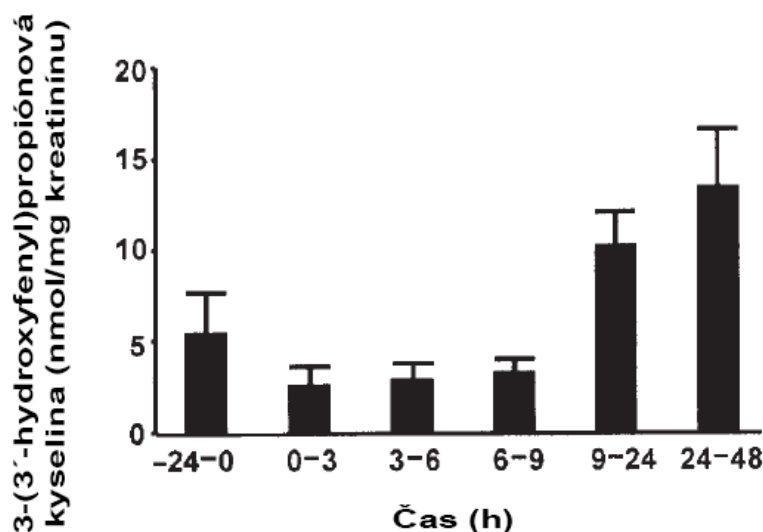
Tab. 9 Porovnanie renálnej exkrécie rozkladných metabolitov

Zástupca	Prijaté množstvo ($\mu\text{mol/deň}^*$)	Renálna exkrécia** (%)	Hlavné fenolické kyseliny
monomérny (+)-katechín	62,3 \pm 2,7	10,6 \pm 1,1	3'-HFP, K, 3'-HB, V, 3'-HH
dimérny prokyanidín B3	65,7 \pm 0,6	6,5 \pm 0,2	3'-HFP, K, 4'-HB, V
trimérny prokyanidín C2	58,5 \pm 0,2	0,7 \pm 0,1	3'-HFV, 3'-HFP, K
zmes polymérov	64,7 \pm 0,7	0,5 \pm 0,1	3'-HFV, 3'-HFP, K

*Skratky kyselín: 3'-HFP, 3-(3'-hydroxyfenyl)propiónová; K, m-kumarová; 3'-HB, 3'-hydroxybenzoová; V, vanilová; 3'-HH, 3'-hydroxyhippurová; 4'-HB, 4'-hydroxybenzoová; 3'-HFV, 5-(3'-hydroxyfenyl)valérová; *hodnoty vyjadrené ako ekvivalenty katechínu; ** množstvo z celkového prijatého, zahrňuje hlavné aj minoritné fenolické kyseliny.*

Spracované údaje z textu podľa Gonthier et al. 2003

Nárast renálnej exkrécie hlavného metabolitu 3-(3'-hydroxyfenyl)propiónovej kyseliny, menej 4-*O*-metylgalovej a 3'-hydroxyfenyloctovej, bol zaznamenaný aj po podaní výťažku z hroznových jadierok (1000 mg polyfenolov/deň) bohatých na PA. Štúdie sa zúčastnilo až 69 dobrovoľníkov (Ward et al. 2004). Podobne po podaní čokolády obsahujúcej 439 mg PA (bližšie neidentifikované) a 147 mg monomérov vzrástla renálna exkrécia kyseliny 3-(3'-hydroxyfenyl)propiónovej, 3'-hydroxyfenyloctovej a okrem nich ešte kyseliny ferulovej, 3',4'-dihydroxyfenyloctovej a 3'-hydroxybenzoovej. Vylučovanie týchto kyselín stúpalo v časovom rozsahu 6 – 48 hodín po podaní. Ukážka časových zmien koncentrácie najviac zastúpenej kyseliny 3-(3'-hydroxyfenyl)propiónovej v moči je na Obr. 33. Fenolické kyseliny v tejto štúdií pochádzali z metabolizmu PA, ale aj monomérnych flavanolov (Rios et al. 2003).



Obr. 33 Vylučovanie močom 3-(3'-hydroxyfenyl)propiónovej kyseliny po konzumácii tmavej čokolády

Závislosť koncentrácie na čase.

Prevzaté a upravené podľa: Rios et al. 2003

Významný nárast γ -valerolaktónu v moči ($53 \pm 11 \mu\text{mol}$ za 24 hodín) u ľudí sa podarilo stanoviť po podaní prokyanidínov (9,9 mg/kg) s polymeračným stupňom 2 – 10. (Ottaviani et al. 2012a). 5-(3',4'-dihydroxyfenyl)- γ -valerolaktón bol dôležitým rozkladným metabolitom diméru PB1. Nachádzal sa v plazme prevažne konjugovaný. Hodnoty c_{max} ale vykazovali veľké individuálne rozdiely, a to od 5 do 469 ng/ml (vyjadrené ako ekvivalenty epikatechínu), s t_{max} v rozmedzí od 8 do 24 hodín. V nižších koncentráciách sa v plazme nachádzali: kyselina 4'-hydroxyfenyloctová, ferulová a 5-

(3',4'-dihydroxyfenyl)- γ -hydroxyvalérová. Minimálne množstvo PB1 sa vylúčilo stolicou, čo naznačuje takmer úplný rozklad mikroflórou. Väčšina týchto produktov je vstrebaná, iba 6 ± 4 % z celkového PB1 bolo prítomných v stolici (Wiese et al. 2015).

Z predchádzajúcich výsledkov by sa dalo zhrnúť, že PA nie sú depolymerizované v žalúdku a nedotknuté sa dostávajú do tenkého čreva. Tam sú dôsledkom svojej zložitej štruktúry ťažko vstrebateľné, avšak niektoré diméry sa v malej miere vstrebávajú. Veľká časť dosahuje hrubé črevo, kde podlieha bakteriálnemu rozkladu na fenolické zlúčeniny, ktoré už sú lepšie vstrebateľné a vylučované hlavne močom. S rastúcim stupňom polymerizácie klesá absorpcia a stúpa odolnosť voči mikrobiálnemu rozkladu.

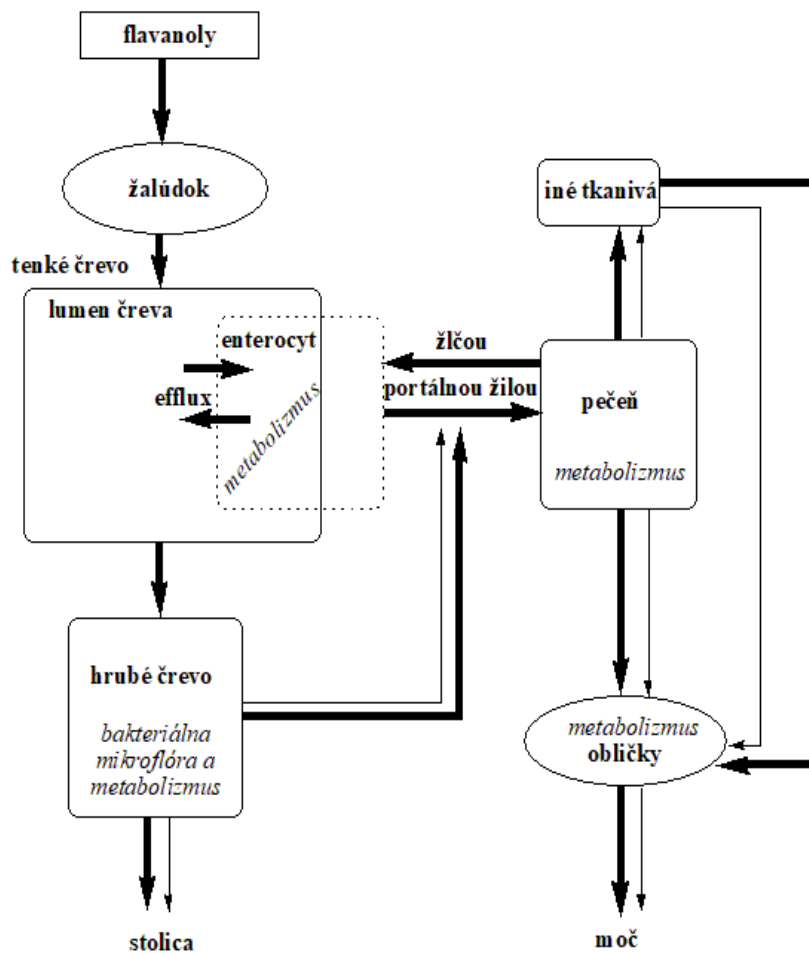
8.6 Teaflavíny a tearubigíny

Teaflavíny a tearubigíny majú zložitú štruktúru, údajov o ich osude v organizme je málo. Napriek tomu sa zistil nárast koncentrácie kyseliny hippurovej ako rozkladného metabolitu v moči, po podaní čierneho čaju. Zlúčeniny sú pravdepodobne rovnako ako predchádzajúce štiepené mikroflórou v hrubom čreve. Presný mechanizmus degradácie nie je zatiaľ známy. Hlavným produktom, ktorý sa následne vstrebáva, je kyselina 3-fenylpropiónová. V organizme ďalej podlieha oxidácii a konjugácii s glycínom (Clifford et al. 2000, Mulder et al. 2005). Po podaní 6 – 10 šálok denne, pričom jedna šálka (310 ml) obsahovala približne 415 mg polyfenolov, z toho asi 360 mg tearubigínov, 26 mg teaflavínov, 17 mg flavanolov, 5 mg flavonolov a 7 mg kyseliny galovej, sa obsah kyseliny hippurovej zvýšil z 153 – 512 na 742 – 1374 mg za deň (Clifford et al. 2000). To značí o tom, že tearubigíny, ako prevažujúca zložka, sú jej významným zdrojom.

Neskôr sa porovnávala renálna exkrécia kyseliny hippurovej po konzumácii zeleného a čierneho čaju (6g sušiny denne, čo odpovedá cca 12 šálkam čaju) u 17 zdravých dobrovoľníkov, za účelom zistenia informácií o metabolickom osude teaflavínov a tearubigínov. Denná dávka celkových polyfenolov v zelenom čaji odpovedala 13,3 mmol (2,21 mmol/g) a v čiernom 9,1 mmol (1,51 mmol/g), vyjadrené ako ekvivalenty kyseliny galovej. V obidvoch prípadoch došlo k nárastu vylučovania v moči za 24 hodín, približne o 2,3 mmol kyseliny hippurovej po podaní zeleného a o 1,9 mmol po podaní čierneho čaju (Mulder et al. 2005). Nevyskytovali sa teda významné rozdiely.

9 Diskusia

V práci som sa snažila zhrnúť informácie o flavanoloch týkajúce sa ich farmakokinetiky. Venovala som sa skupine ako celku a následne jednotlivým predstaviteľom bežne dostupným v potrave. Z monomérov je najviac skúmaný (-)-epikatechín. U ostatných zlúčenín som sa zamerala hlavne na rozdiely a porovnanie s ním. Odlišné vlastnosti majú oligomérne a polymérne formy. Najviac zastúpenými sú prokyanidíny, ktorými sa zaoberalo veľa pôvodných štúdií, kvôli ich pozitívnym účinkom na organizmus. O teaflavínoch a tearubigínov je údajov menej, pravdepodobne pre zložitosť štruktúry. Potenciálny osud flavanолоv v organizme je schematicky znázornený na základe komplexne spracovaných informácií na Obr. 34.



Obr. 34 Schematicky znázornený osud flavanолоv v organizme

Tmavé šípky znázorňujú pravdepodobný osud flavanолоv a ich metabolitov vzniknutých za katalýzy ľudských enzýmov, tenkou čiarou pravdepodobný osud produktov bakteriálneho rozkladu a ich konjugátov.

Na základe spracovaných štúdií, viď použitá literatúra

Pre kritické zhodnotenie výsledkov je potrebné brať do úvahy viacero faktorov. Pri spracovávaní pôvodných štúdií som sa stretla s variabilnými výsledkami. Porovnanie bolo zložité a údaje sa nedali vždy zovšeobecniť. Líšili sa podmienky, metódy, podávaný substrát aj dávky. Vo väčšine prípadov sa štúdií zúčastňovalo málo subjektov (menej ako 10), výsledky ťažko reprezentovali správanie zlúčeniny v celej populácii.

Autori využívali rôzne spôsoby úpravy materiálu. Rozdielmi postupov z viacerých štúdií sa zaoberali napríklad Actis-Goretta et al. (2012) pri vývoji metódy. Porovnávala sa konkrétne extrakcia na pevnej fáze, proteínová precipitácia z predošlých výskumov a nová metóda: spojenie proteínovej precipitácie a odstránenie fosfolipidov. Potvrdili sa nezrovnalosti vo výťažnosti metabolitov. Dôvodom bola rozdielna účinnosť extrakcie. Výťažnosť proteínovej precipitácie bola v každom prípade pod 75 % a variabilná medzi zástupcami (líšila sa až okolo 45 %). Po extrakcii na pevnej fáze to bolo viac, ale výsledky sa opäť dosť líšili. S ich novou metódou sa zvýšila až na viac ako 90 % (Actis-Goretta et al. 2012, Ottaviani et al. 2012b). Tieto údaje sú zvolené z vybraných štúdií, aby som poukázala na jeden z faktorov, ovplyvňujúcich vysokú variabilitu v zastúpení a koncentráciách metabolitov.

Staršie štúdie analyzovali flavanoly až po enzymatickom rozklade za použitia glukuronidáz a sulfatáz (Baba et al. 2000, Piskula a Terao 1998). Tento spôsob má však nevýhodu v tomže nie sú dostupné informácie o jednotlivých metabolitoch. Dochádzalo teda k skresleným výsledkom. Okrem toho, po podrobení metabolitov hydrolýze enzýmami rôzneho pôvodu sa jej rozsah líšil, v závislosti na pôvode glukuronidázy a arylsulfatázy (Ottaviani et al. 2012b).

Dostupnosť syntetických štandardov je podstatným predpokladom správnych a presných výsledkov. Práve ich nedostupnosť bola častou limitáciou. V niektorých štúdiách, hlavne starších, sa nepodarilo získať kompletný metabolický profil zlúčeniny. Problémom bývalo aj určenie pozície konjugácie (Barnett et al. 2015, Piskula a Terao 1998, Stalmach et al. 2010). Dnes sú už známe nové metódy chemickej syntézy štandardov metabolitov (Ottaviani et al. 2016, Zhang et al. 2013). Spolu s novšími a presnejšími postupmi, to znamená umožnenie detailnejšieho popisu metabolických profilov zlúčenín, čo je veľkou výhodou do budúcnosti.

Z analytických metód sa používalo hlavne spojenie HPLC a MS s rôznymi obmenami (Borges et al. 2016, Ottaviani et al. 2012b). Občas bola využitá aj plynová chromatografia (Déprez et al. 2000, Roowi et al. 2010). Používali sa tiež rôzne detektory. Medzi moderné patria online detektory rádioaktivity. Umožňujú detailnejší popis metabolitov (Ottaviani et al. 2016, Borges et al. 2016). Zistené výsledky za použitia rôznej detekcie sa môžu líšiť. Uvediem jeden z príkladov: nízky fluorescenčný signál sulfátov mohol byť príčinou toho, že neboli v minulosti detekované pri použití fluorescenčných detektorov (Ottaviani et al. 2012b). Nejednotné metódy mohli byť taktiež dôsledkom variability.

Ďalej spomeniem obrovské rozdiely v podávanom substráte, od čistých zlúčenín cez rozmanité druhy potravy bohatej na flavanoly. Aby sa zamedzilo vplyvu polyfenolov z ostatnej prijímanej potravy, boli snahy to eliminovať. Vo väčšine prípadov išlo o dodržiavanie nízko flavanolovej diéty. Účastníci boli oboznámení napríklad s obmedzením konzumácie zeleniny, ovocia, čokolády, alkoholu, kávy, čaju, grepového džúsu, fajčenia a dodržiavaním pitného režimu (Actis-Goretta et al. 2012, Baba et al. 2000, Barnett et al. 2015, Ottaviani et al. 2012b). Zložky potravy mohli ovplyvniť napríklad uvoľnenie zlúčenín, čoho výsledkom bol napríklad vyšší t_{max} . Vo veľa prípadoch sa podávali PA a monoméry spoločne, prípadne podávané výt'ažky PA neboli úplne charakterizované (Tsang et al. 2005). Výsledky potom neboli jednoznačné. U rozkladných produktov nebolo jasné, z ktorých látok presne pochádzajú.

Vyskytovali sa aj individuálne rozdiely. Veľký vplyv mala variabilná mikroflóra jednotlivcov (Del Rio et al. 2010), preto boli opäť prítomné rozdiely v zastúpení rozkladných metabolitov. Mali by sa brať do úvahy viac aj medzidruhové rozdiely, hlavne medzi potkanmi a ľuďmi. Okrem toho u štúdií na potkanoch mohlo mať vplyv použitie rôznych kmeňov. Vo väčšine štúdií šlo o kmeň Wistar (Donovan et al. 2002, Harada et al. 1999, Piskula a Terao 1998), v niektorých to bol kmeň Sprague-Dawley (Natsume et al. 2003, Borges et al. 2016, Tsang et al. 2005). Táto súvislosť nebola objasnená úplne, mohla však podľa viacerých výskumných skupín ovplyvniť výsledky.

U flavanolov je obzvlášť dôležitá identifikácia a kvantifikácia metabolitov, kvôli rozsiahlemu metabolizmu základných látok. Metabolity sú pravdepodobne vo veľkej miere zodpovedné za biologické funkcie tejto skupiny. V budúcnosti je dôležité sústrediť sa práve na podrobnejšie preskúmanie ich farmakokinetiky. Netýka sa to len metabolitov II. fázy, ale aj rozkladných produktov. Ako sa ukázalo, majú vysoký potenciál.

Objasnenie osudu rozkladných produktov by malo význam rovnako pri oligomérnych a polymérnych formách, u ktorých sú práve tie hlavnými absorbovanými zlúčeninami v organizme.

Napriek snahe o zjednotenie dostupných údajov, bolo ich vzájomné porovnanie náročné. Bolo by vhodné preskúmať súvislosti u vyššieho počtu ľudí, nielen po jednorazovej dávke, ale aj po dlhodobom podaní. Ohľad by sa mal brať aj na vyššie popísané rozdiely.

10 Záver

Cieľom tejto práce bolo zhrnúť dostupné informácie o farmakokinetike flavanolov. Sú to prírodné opticky aktívne zlúčeniny nachádzajúce sa v bežnej rastlinnej strave. Ide o komplexnú skupinu látok s viacerými obmenami štruktúry. Špecifický je výskyt vo forme aglykónov. Okrem monomérov sa vyskytujú oligomérne až polymérne látky. Typická je aj galoylácia. Medzi jednotlivými predstaviteľmi existujú mnohé rozdiely a výsledky sú nejednotné.

Pred vstupom do obehu zlúčeniny podliehajú vo veľkej miere presystémovej eliminácii. Významný vplyv na absorpciu má efflux a metabolizmus v enterocytoch, taktiež metabolizmus pri prechode pečeňou. Rozsah absorpcie okrem toho ovplyvňuje mnoho faktorov, napríklad: podaná dávka, pH, matricové efekty a individuálne rozdiely medzi jedincami. Epikatechín sa vstrebáva lepšie ako katechín. V plazme sú obidva prítomné prevažne konjugované a vylučujú sa obličkami do moču, minimálne žľou. Galoylácia znižuje absorpciu. V plazme prevládajú voľné galáty, ktoré majú pri transporte krvou najvyššiu afinitu k albumínu. Sú vo veľkej miere vylučované do žlči. (Epi)galokatechíny sa vyskytujú v plazme konjugované a vstrebávajú sa menej ako (epi)katechíny. S rastúcim polymeračným stupňom dochádza k poklesu absorpcie. Čo sa týka metabolizmu, dominuje glukuronidácia, sulfatácia a metylácia, prípadne ich kombinácie.

Ak sa parentné zlúčeniny a effluxované metabolity dostanú až do hrubého čreva, sú tam bakteriálne degradované. Vzniknuté jednoduchšie produkty môžu byť vstrebané do obehu, konjugované a vylúčené. Toto odhalenie výrazne zvýšilo predpokladané odhady rozsahu absorpcie. Dôležitú úlohu má bakteriálna mikroflóra aj u proantokyanidínov, teaflavínov a tearubigínov. Štiepenie sa znižuje s polymeračným stupňom. Rozkladné produkty sú detekované hlavne v plazme a v moči. V moči prekračujú koncentrácie metabolitov s nedotknutým kruhom. Naprieč štúdiami sa ich zloženie a koncentrácie značne líšia.

Zoznam obrázkov

Obr. 1 Základná štruktúra flavonoidov s číslovaním.....	10
Obr. 2 Štruktúra flavan-3-ol.....	11
Obr. 3 (+)-katechín a (-)-epikatechín	12
Obr. 4 (-)-katechín a (+)-epikatechín	12
Obr. 5 (-)-epigalokatechín, (+)-galokatechín, (+)-afzelechín a (-)-epiafzelechín	13
Obr. 6 (-)-epikatechín-3-O-galát a (-)-epigalokatechín-3-O-galát	13
Obr. 7 Štruktúry vybraných zástupcov proantokyanidínov	15
Obr. 8 Prokyanidín C2	15
Obr. 9 Obecná štruktúra teaflavínov	16
Obr. 10 Stručná schéma biosyntézy flavonoidov v rastlinách.....	19
Obr. 11 Kumulatívna absorpcia katechínu, epikatechínu a ich metabolitov za 90 min perfúzie cez izolované potkanie jejunum a ileum.....	27
Obr. 12 Priemerné závislosti plazmatickej koncentrácie na čase voľného (-)-epigalokatechín-galátu (EGCG).....	28
Obr. 13 Graf závislosti plazmatickej koncentrácie na čase voľného (-)-epikatechínu ..	29
Obr. 14 Rovnica výpočtu koeficientu zdanlivej permeability	31
Obr. 15 Stabilita čajových katechínov a teaflavínov	31
Obr. 16 Účinnosť transportu cez hCMEC/D3 bunky v závislosti na čase.....	33
Obr. 17 Stabilizácia katechínov ľudským sérovým albumínom.....	35
Obr. 18 Konjugácia kyseliny benzoovej s glycinom za vzniku kyseliny hippurovej.....	38
Obr. 19 Potenciálne premeny proantokyanidínov a katechínov na rozkladné produkty	40
Obr. 20 Rozdiel v exkrécii rádioaktivity po podaní [2- ¹⁴ C](-)-epikatechínu (¹⁴ C-EC) u človeka	41
Obr. 21 Schematické znázornenie multilumenálneho perfúzneho katétra v jejune.....	44
Obr. 22 Zmeny koeficientov zdanlivej permeability (P_{app}) po podaní 50 $\mu\text{mol/l}$ inhibítorov.....	45
Obr. 23 Základné metabolity (-)-epikatechínu.....	46
Obr. 24 Rozdiely v zastúpení metabolitov (-)-epikatechínu v plazme u človeka po podaní rôznych substrátov	47
Obr. 25 Metabolizmus epikatechínu v závislosti na stereochemii.....	50
Obr. 26 Druhovo závislé rozdiely v metabolizme [2- ¹⁴ C](-)-epikatechínu.....	52

Obr. 27 Celková renálna exkrécia metabolitov (+)-katechínu a (-)-epikatechínu u potkanov	54
Obr. 28 Štiepenie epigalokatechínalátu (EGCG) bakteriálnou mikroflórou	56
Obr. 29 Model absorpcie epikatechínalátu v enterocytoch	57
Obr. 30 Štruktúra 5-(3',4',5'-trihydroxyfenyl)- γ -valerolaktón	58
Obr. 31 Graf závislosti percentuálneho podielu prokyanidínov a monomérov z celkového množstva flavanolov v žalúdku, na čase, po podaní kakaového nápoja	60
Obr. 32 Graf závislosti pH žalúdka na čase, po podaní 500 ml kakaového nápoja s obsahom 37,5 g kakaového prášku	61
Obr. 33 Vylučovanie močom 3-(3'-hydroxyfenyl)propiónovej kyseliny po konzumácii tmavej čokolády	63
Obr. 34 Schematicky znázornený osud flavanolov v organizme	65

Zoznam tabuliek

Tab. 1 Vybrané prokyanidíny typu A, B a C	14
Tab. 2 Prírodné zdroje proantokyandínov typu B	17
Tab. 3 Flavanoly v ileálnej tekutine za 24 hodín po konzumácii 300 ml zeleného čaju	25
Tab. 4 Porovnanie časových parametrov vybraných metabolitov u zdravých dobrovoľníkov a u ileostomikov, po podaní zeleného čaju	26
Tab. 5 Metabolity epikatechínu a katechínu II. fázy metabolizmu detekované v mozgovom tkanive po dvoch hodinách od podania.....	34
Tab. 6 Farmakokinetické parametre (–)-epikatechínu po jednorazovom podaní u ľudí	43
Tab. 7 Farmakokinetické parametre vybraných metabolitov (–)-epikatechínu	49
Tab. 8 Hodnoty c_{max} a AUC_{0-4} metabolitov flavanolov	61
Tab. 9 Porovnanie renálnej exkrécie rozkladných metabolitov	62

Použitá literatúra

Abd El Mohsen MM et al. Uptake and metabolism of epicatechin and its access to the brain after oral ingestion. *Free Radic Biol Med* 2002;33(12):1693-1702.

Actis-Goretta L et al. Elucidation of (–)-epicatechin metabolites after ingestion of chocolate by healthy humans. *Free Radic Biol Med* 2012;53(4):787-795.

Actis-Goretta L et al. Intestinal absorption, metabolism, and excretion of (–)-epicatechin in healthy humans assessed by using an intestinal perfusion technique. *Am J Clin Nutr* 2013;98(4):924-933.

Appeldoorn MM, Vincken JP, Aura AM, Hollman PC, Gruppen H. Procyanidin dimers are metabolized by human microbiota with 2-(3,4-dihydroxyphenyl)acetic acid and 5-(3,4-dihydroxyphenyl)- γ -valerolactone as the major metabolites. *J Agric Food Chem* 2009a;57(3):1084-1092.

Appeldoorn MM, Vincken JP, Gruppen H, Hollman PC. Procyanidin dimers A1, A2, and B2 are absorbed without conjugation or methylation from the small intestine of rats. *J Nutr* 2009b;139(8):1469-1473.

Arola-Arnal A et al. Distribution of grape seed flavanols and their metabolites in pregnant rats and their fetuses. *Mol Nutr Food Res* 2013;57(10):1741-1752.

Aron PM a Kennedy JA. Flavan-3-ols: nature, occurrence and biological activity. *Mol Nutr Food Res* 2008;52(1):79-104.

Artursson P a Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;175(3):880-885.

Auger C, Mullen W, Hara Y, Crozier A. Bioavailability of polyphenon E flavan-3-ols in humans with an ileostomy. *J Nutr* 2008;138(8)(Suppl):1535S-1542S.

Aura AM, Mattila I, Seppänen-Laakso T, Miettinen J, Oksman-Caldentey KM, Orešič M. Microbial metabolism of catechin stereoisomers by human faecal microbiota: Comparison of targeted analysis and a non-targeted metabolomics method. *Phytochem Lett* 2008;1(1):18-22.

Baba S et al. Bioavailability of (-)-epicatechin upon intake of chocolate and cocoa in human volunteers. *Free Radic Res* 2000;33(5):635-641.

Baba S, Osakabe N, Natsume M, Muto Y, Takizawa T, Terao J. In vivo comparison of the bioavailability of (+)-catechin, (-)-epicatechin and their mixture in orally administered rats. *J Nutr* 2001;131(11):2885-2891.

Baba S, Osakabe N, Natsume M, Terao J. Absorption and urinary excretion of procyanidin B2 [epicatechin-(4 β -8)-epicatechin] in rats. *Free Radic Biol Med* 2002;33(1):142-148.

Barnett CF et al. Pharmacokinetic, partial pharmacodynamic and initial safety analysis of (-)-epicatechin in healthy volunteers. *Food Funct* 2015;6(3):824-833.

Beecher GR. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J Nutr* 2003;133(10)(Suppl):3248S-3254S.

Borges G, Mullen W, Mullan A, Lean ME, Roberts SA, Crozier A. Bioavailability of multiple components following acute ingestion of a polyphenol-rich juice drink. *Mol Nutr Food Res* 2010;54(Suppl 2):268S-277S.

Borges G, Lean ME, Roberts SA, Crozier A. Bioavailability of dietary (poly)phenols: a study with ileostomists to discriminate between absorption in small and large intestine. *Food Funct* 2013;4(5):754-762.

Borges G, van der Hooft JJ, Crozier A. A comprehensive evaluation of the [2-¹⁴C](-)-epicatechin metabolome in rats. *Free Radic Biol Med* 2016;99:128-138.

Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 1998;56(11):317-333.

Býma S a Hradec J. Prevence kardiovaskulárních onemocnění – novelizace 2013. Doporučené diagnostické a terapeutické postupy pro všeobecné praktické lékaře. Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP 2013.

Calani L, Del Rio D, Callegari ML, Morelli L, Brighenti F. Updated bioavailability and 48 h excretion profile of flavan-3-ols from green tea in humans. *Int J Food Sci Nutr* 2012;63(5):513-521.

Clifford M. A nomenclature for phenols with special reference to tea. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2001;41(Appendix 1):393-397.

Clifford MN, Copeland EL, Bloxside JP, Mitchell LA. Hippuric acid as a major excretion product associated with black tea consumption. *Xenobiotica* 2000;30(3):317-326.

Clifford MN. Phenol protein interactions and their possible significance for astringency. In: Birch GG and Lindley MG, eds. *Interaction of food components*. London: Elsevier Applied Science, 1986:143-164.

Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep* 2009;26(8):1001-1043.

Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Phenols, polyphenols and tannins: an overview. In: Crozier A, Clifford MN, Ashihara H, eds. *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet*. Oxford: Blackwell Publishing, 2006a:1-24.

Crozier A, Yokota T, Jaganath IB, Marks S, Saltmarsh M, Clifford MN. Secondary metabolites in fruits, vegetables, beverages and other plant-based dietary components. In: Crozier A, Clifford MN, Ashihara H, eds. *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet*. Oxford: Blackwell Publishing, 2006b:208-302.

Del Rio D, Calani L, Cordero C, Salvatore S, Pellegrini N, Brighenti F. Bioavailability and catabolism of green tea flavan-3-ols in humans. *Nutrition* 2010;26(11-12):1110-1116.

Del Rio D et al. HPLC-MSⁿ analysis of phenolic compounds and purine alkaloids in green and black tea. *J Agric Food Chem* 2004;52(10):2807-2815.

Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JPE, Tognolini M, Borges G, Crozier A. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal* 2013;18(14):1818-1892.

Déprez S et al. Polymeric proanthocyanidins are catabolized by human colonic microflora into low-molecular-weight phenolic acids. *J Nutr* 2000;130(11):2733-2738.

Dixon RA, Xie DY, Sharma SB. Proanthocyanidins – a final frontier in flavonoid research? *New Phytol* 2005;165(1):9-28.

Donovan JL et al. Catechin is metabolized by both the small intestine and liver of rats. *J Nutr* 2001;131(6):1753-1757.

Donovan JL et al. Catechin is present as metabolites in human plasma after consumption of red wine. *J Nutr* 1999;129(9):1662-1668.

Donovan JL, Manach C, Rios L, Morand C, Scalbert A, Rémésy C. Procyanidins are not bioavailable in rats fed a single meal containing a grapeseed extract or the procyanidin dimer B3. *Br J Nutr* 2002;87(4):299-306.

Drynan JW, Clifford MN, Obuchowicz J, Kuhnert N. The chemistry of low molecular weight black tea polyphenols. *Nat Prod Rep* 2010;27(3):417-462.

Faria A et al. Flavonoid metabolites transport across a human BBB model. *Food Chem* 2014;149:190-196.

Gonthier MP, Donovan JL, Texier O, Felgines C, Remesy C, Scalbert A. Metabolism of dietary procyanidins in rats. *Free Radic Biol Med* 2003;35(8):837-844.

Harada M et al. Identification of the major antioxidative metabolites in biological fluids of the rat with ingested (+)-catechin and (-)-epicatechin. *Biosci Biotechnol Biochem* 1999;63(6):973-977.

Haslam E. Symmetry and promiscuity in procyanidin biochemistry. *Phytochemistry* 1977;16(11):1625-1640.

Henning SM, Choo JJ, Heber D. Nongallated compared with gallated flavan-3-ols in green and black tea are more bioavailable. *J Nutr* 2008;138(8)(Suppl):1529S-1534S.

Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* 2002;13(10):572-584.

Hollman PC. Absorption, bioavailability, and metabolism of flavonoids. *Pharm Biol* 2004;42(Suppl):74-83.

Holt RR et al. Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4 β -8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa. *Am J Clin Nutr* 2002;76(4):798-804.

Holton TA a Cornish EC. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *The Plant Cell* 1995;7(7):1071-1083.

Huang C, Chen Y, Zhou T, Chen G. Sulfation of dietary flavonoids by human sulfotransferases. *Xenobiotica* 2009;39(4):312-322.

Chen L, Lee MJ, Li H, Yang CS. Absorption, distribution, elimination of tea polyphenols in rats. *Drug Metab Dispos* 1997;25(9):1045-1050.

Chow HH et al. Effects of dosing condition on the oral bioavailability of green tea catechins after single-dose administration of Polyphenon E in healthy individuals. *Clin Cancer Res* 2005;11(12):4627-4633.

Chow HH et al. Pharmacokinetics and safety of green tea polyphenols after multiple-dose administration of epigallocatechin gallate and polyphenon E in healthy individuals. *Clin Cancer Res* 2003;9(9):3312-3319.

Ishii T et al. Binding affinity of tea catechins for HSA: characterization by high-performance affinity chromatography with immobilized albumin column. *Mol Nutr Food Res* 2010;54(6):816-822.

Ishii T et al. Human serum albumin as an antioxidant in the oxidation of (-)-epigallocatechin gallate: participation of reversible covalent binding for interaction and stabilization. *Biosci Biotechnol Biochem* 2011;75(1):100-106.

Kuhnle G et al. Epicatechin and catechin are O-methylated and glucuronidated in the small intestine. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;277(2):507-512.

Lee MJ et al. Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11(10):1025-1032.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004;79(5):727-747.

Marais JPJ, Deavours B, Dixon RA, Ferreira D. The stereochemistry of flavonoids. In: Grotewold E, eds. The science of flavonoids. Ohio, USA: Springer Science+Business Media, 2006:1-46.

Margalef M, Pons Z, Bravo F, Muguerza B, Arola-Arnal A. Tissue distribution of rat flavanol metabolites at different doses. *J Nutr Biochem* 2015;26(10):987-995.

Meng X et al. Identification and characterization of methylated and ring-fission metabolites of tea catechins formed in humans, mice, and rats. *Chem Res Toxicol* 2002;15(8):1042-1050.

Merken HM a Beecher GR. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. *J Agric Food Chem* 2000;48(3):577-599.

Mladěnka P, Zatloukalová L, Filipský T, Hrdina R. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radic Biol Med* 2010;49(6):963-975.

Mulder TP, Rietveld AG, van Amelsvoort JM. Consumption of both black tea and green tea results in an increase in the excretion of hippuric acid into urine. *Am J Clin Nutr* 2005;81(Suppl):256S-260S.

Natsume M et al. Structures of (–)-epicatechin glucuronide identified from plasma and urine after oral ingestion of (–)-epicatechin: differences between human and rat. *Free Radic Biol Med* 2003;34(7):840-849.

Ottaviani JI, Kwik-Urbe C, Keen CL, Schroeter H. Intake of dietary procyanidins does not contribute to the pool of circulating flavanols in humans. *Am J Clin Nutr* 2012a;95(4):851-858.

Ottaviani JI, Momma TY, Kuhnle GK, Keen CL, Schroeter H. Structurally related (–)-epicatechin metabolites in humans: Assessment using de novo chemically synthesized authentic standards. *Free Radic Biol Med* 2012b;52(8):1403-1412.

Ottaviani JI et al. The metabolome of [2-¹⁴C](–)-epicatechin in humans: implications for the assessment of efficacy, safety, and mechanisms of action of polyphenolic bioactives. *Sci Rep* 2016;6:29034.

Ou K, Sarnoski P, Schneider KR, Song K, Khoo C, Gu L. Microbial catabolism of procyanidins by human gut microbiota. *Mol Nutr Food Res* 2014;58(11):2196-2205.

Petrussa E et al. Plant flavonoids—biosynthesis, transport and involvement in stress Responses. *Int J Mol Sci* 2013;14(7):14950-14973.

Piskula MK a Terao J. Accumulation of (–)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. *J Nutr* 1998;128(7):1172-1178.

Rios LY et al. Chocolate intake increases urinary excretion of polyphenol-derived phenolic acids in healthy human subjects. *Am J Clin Nutr* 2003;77(4):912-918.

Rios LY, Bennett RN, Lazarus SA, Rémésy C, Scalbert A, Williamson G. Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans. *Am J Clin Nutr* 2002;76(5):1106-1110.

Roowi S, Stalmach A, Mullen W, Lean ME, Edwards CA, Crozier A. Green tea flavan-3-ols: colonic degradation and urinary excretion of catabolites by humans. *J Agric Food Chem* 2010;58(2):1296-1304.

Rowland A, Miners JO, Mackenzie PI. The UDP-glucuronosyltransferases: Their role in drug metabolism and detoxification. *Int J Biochem Cell Biol* 2013;45(6):1121-1132.

Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stamatii A, Zucco F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol* 2005;21(1):1-26.

Sano A, Yamakoshi J, Tokutake S, Tobe K, Kubota Y, Kikuchi M. Procyanidin B1 is detected in human serum after intake of proanthocyanidin-rich grape seed extract. *Biosci Biotechnol Biochem* 2003;67(5):1140-1143.

Santos-Buelga C a Scalbert A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds- nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J Sci Food Agric* 2000;80(7):1094-1117.

Schijlen EG, Ric de Vos CH, van Tunen AJ, Bovy AG. Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry* 2004;65(19):2631-2648.

Song WO a Chun OK. Tea is the major source of flavan-3-ol and flavonol in the U.S. diet. *J Nutr* 2008;138(8)(Suppl):1543S-1547S.

Spencer JP, Chowrimootoo G, Choudhury R, Debnam ES, Srai SK, Rice-Evans C. The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Lett* 1999;458(2):224-230.

Spencer JP, Schroeter H, Shenoy B, Srai SK, Debnam ES, Rice-Evans C. Epicatechin is the primary bioavailable form of the procyanidin dimers B2 and B5 after transfer across the small intestine. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;285(3):588-593.

Stalmach A, Mullen W, Steiling H, Williamson G, Lean ME, Crozier A. Absorption, metabolism, and excretion of green tea flavan-3-ols in humans with an ileostomy. *Mol Nutr Food Res* 2010;54(3):323-334.

Sun H, Chow EC, Liu S, Du Y, Pang KS. The Caco-2 cell monolayer: usefulness and limitations. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2008;4(4):395-411.

Tanner GJ, Francki KT, Abrahams S, Watson JM, Larkin PJ, Ashton AR. Proanthocyanidin biosynthesis in plants. Purification of legume leucoanthocyanidin reductase and molecular cloning of its cDNA. *J Biol Chem* 2003;278(34):31647-31656.

Tsang C et al. The absorption, metabolism and excretion of flavan-3-ols and procyanidins following the ingestion of a grape seed extract by rats. *Br J Nutr* 2005;94(2):170-181.

Vaidyanathan JB a Walle T. Cellular uptake and efflux of the tea flavonoid (-)-epicatechin-3-gallate in the human intestinal cell line Caco-2. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;307(2):745-752.

Vaidyanathan JB a Walle T. Glucuronidation and sulfation of the tea flavonoid (-)-epicatechin by the human and rat enzymes. *Drug Metab Dispos* 2002;30(8):897-903.

Vaidyanathan JB a Walle T. Transport and metabolism of the tea flavonoid (-)-epicatechin by the human intestinal cell line Caco-2. *Pharm Res* 2001;18(10):1420-1425.

Van Citters GW a Lin HC. Ileal brake: neuropeptidergic control of intestinal transit. *Curr Gastroenterol Rep* 2006;8(5):367-373.

Wang H, Provan GJ, Helliwell K. Tea flavonoids: their functions, utilisation and analysis. *Trends Food Sci Technol* 2000;11(4-5):152-160.

Ward NC, Croft KD, Puddey IB, Hodgson JM. Supplementation with grape seed polyphenols results in increased urinary excretion of 3-hydroxyphenylpropionic acid, an important metabolite of proanthocyanidins in humans. *J Agric Food Chem* 2004;52(17):5545-5549.

Waterhouse AL. Wine phenolics. *Ann N Y Acad Sci* 2002;957:21-36.

Wiese S et al. Comparative biokinetics and metabolism of pure monomeric, dimeric, and polymeric flavan-3-ols: a randomized cross-over study in humans. *Mol Nutr Food Res* 2015;59(4):610-621.

Williamson G a Manach C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am J Clin Nutr* 2005;81(Suppl):243S-355S.

Winkel-Shirley B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr Opin Plant Biol* 2002;5(3):218-223.

Winter J, Moore LH, Dowel VR, Bokkenheuser VD. C-Ring cleavage of flavonoids by human intestinal bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1989;55(5):1203-1208.

Yang CHS, Lee MJ, Chen L. Human salivary tea catechin levels and catechin esterase activities: Implication in human cancer prevention studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8(1):83-89.

Zhang M, Zheng Y, Chow MSS, Zuo Z. Investigation of intestinal absorption and disposition of green tea catechins by Caco-2 monolayer model. *Int J Pharm* 2004;287(1-2):1-12.

Zhang M, Jagdmann GE Jr ,Zandt MV, Sheeler R, Beckett P, Schroeter H. Chemical synthesis and characterization of epicatechin glucuronides and sulfates: bioanalytical standards for epicatechin metabolite identification. *J Nat Prod* 2013;76(2):167-169.

Ziegler K, Tumova S, Kerimi A, Williamson G. Cellular asymmetric catalysis by UDP-glucuronosyltransferase 1A8 shows functional localization to the basolateral plasma membrane. *J Biol Chem* 2015;290(12):7622-7633.