

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Andrea Hušková

Interakce střevní mikroflóry s myricetinem
Interaction of gut microflora with myricetin

Bakalářská práce

Vedoucí práce: prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Praha, 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením prof. RNDr. Petra Hodka, CSc. a veškeré použité zdroje jsem řádně citovala.

V Praze dne

.....
Andrea Hušková

Poděkování

Zde bych ráda poděkovala svému školiteli prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za jeho ochotu, hodnotné rady, trpělivost a čas, jenž mi věnoval při sepisování a tvorbě této práce. Dále bych nemohla přehlédnout všestrannou pomoc při experimentální práci, za kterou rovněž vděčím MVDr. Jiřímu Šimůnkovi, CSc.. V neposlední řadě děkuji i doc. RNDr. Václavu Martínkovi, Ph.D. za užitečné rady při měření na HPLC.

Abstrakt

Střevní mikroflóra by se dala považovat za „zapomenutý“ orgán lidského těla. V gastrointestinálním traktu se střevní mikroorganismy podílejí na přeměně cizorodých látek (včetně léčiv) na jejich aktivní či neaktivní metabolity, a tak ovlivňují jejich biologickou aktivitu. Různorodost mikroorganismů ve střevech rozličných hostitelů vede k rozdílným metabolickým reakcím cizorodých látek. Tato diverzifikace má přirozeně za následek různorodost výsledných metabolitů mezi hostitelskými organismy. Na tento fakt je potřeba se zaměřit při studování a testování nových léčiv a taktéž potravních doplňků, jejichž mikrobiální metabolity, hlavně při orálním podání, mohou mít závažné následky pro hostitelský organismus.

V této práci byla sledována vzájemná interakce myricetinu s fekálními bakteriemi, které byly vystavovány různým podmínkám prostředí. Pro experimenty byla využita metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), pomocí které byla zjišťována rychlost degradace myricetinu a potenciální vznik dihydromyricetinu jako redukovaného metabolitu. Efekt myricetinu na růst fekálních bakterií byl studován technikou PCR-DGGE. Z izolované DNA bakterií byl metodou PCR amplifikován úsek DNA odpovídající 16S rRNA. PCR produkty byly následně separovány na denaturačním gradientovém polyakrylamidovém gelu.

Provedením experimentů bylo zjištěno, že myricetin je degradován fekálními bakteriemi v anaerobních podmínkách v McDougallově pufru za 10 hodin a v BHI mediu při anaerobních podmínkách za 3 hodiny. Za stejný čas (3 hodiny) byl myricetin degradován v aerobních podmínkách v McDougallově pufru. Dihydromyricetin nebyl po analýze na HPLC prokázán jako redukovaný metabolit myricetinu. Metodou PCR-DGGE bylo pak shledáno, že studovaný flavonoid ovlivňuje růst bakterií.

Klíčová slova: bakterie, střevo, flavonoid, metabolismus

Abstract

Intestinal microflora could be considered a “forgotten” organ of the human body. In the gastrointestinal tract, xenobiotics (including drugs) can be converted into their active or inactive forms by intestinal microorganisms via various metabolic pathways. This, in turn, affects their biological activity. The variability of microorganisms in the hosts intestines leads to diverse metabolic reactions of xenobiotics. Thus, the resulting metabolites may vary across host organisms. It is almost imperative to keep this fact in mind while studying and testing new drugs, as well as dietary supplements, because many microbial metabolites can have serious implications for host organisms, especially when administered orally.

In this work, mutual interaction between myricetin and faecal bacteria originating from human intestines was studied under various conditions. For the experiments, a high performance liquid chromatography (HPLC) method was used to determine the rate of myricetin degradation and the potential formation of dihydromyricetin as a reductive metabolite. The effect of myricetin on the growth of faecal bacteria was studied by PCR-DGGE. From the isolated DNA of the bacteria, the DNA sequence corresponding to 16S rRNA was amplified by the PCR method. The PCR products were then separated on a denaturing gradient polyacrylamide gel.

Carrying out the experiments we found that myricetin was degraded by faecal bacteria under anaerobic conditions in McDougall’s buffer and in BHI medium in 10 and 3 hours, respectively. Within the same time (3 hours), myricetin was degraded under aerobic conditions in McDougall’s buffer. Employing the HPLC, it was shown that dihydromyricetin is not a reduced myricetin metabolite. Finally, using the PCR-DGGE method, it was found that the flavonoid studied herein affects the growth of bacteria.

Keywords: bacteria, intestines, flavonoid, metabolism

Obsah

1	Seznam zkratk	8
2	Úvod	9
2.1	Střevní mikroflóra	9
2.1.1	Složení střevní mikroflóry	9
2.1.1.1	Typy bakterií střevní mikroflóry	10
2.1.2	Funkce střevní mikroflóry	10
2.2	Vliv střevní mikroflóry na metabolismus cizorodých látek	11
2.2.1	Redukční reakce mikrobiální biotransformace	12
2.2.2	Hydrolytické reakce mikrobiální biotransformace	13
2.3	Vliv xenobiotik na složení mikroflóry	13
2.4	Experimentální modely pro studium mikrobiálního metabolismu léčiv	14
2.5	Flavonoidy a jejich mikrobiální metabolismus	14
2.5.1	Flavonoidy	14
2.5.2	Mikrobiální přeměny flavonoidních látek	15
2.5.3	Myricetin	17
2.5.4	Dihydromyricetin	17
3	Cíl práce	19
4	Materiál a metody	20
4.1	Materiál	20
4.1.1	Použité chemikálie	20
4.1.2	Použité přístroje	21
4.2	Metody	23
4.2.1	Optimalizace extrakce	23
4.2.1.1	Příprava zásobní suspenze	23
4.2.1.2	Extrakce za použití různých rozpouštědel	23
4.2.2	Aerobní a anaerobní kultivace myricetinu s fekálními bakteriemi	23

4.2.2.1	Příprava McDougallova pufru a BHI média.....	23
4.2.2.2	Příprava vzorků.....	23
4.2.3	Extrakce myricetinu.....	24
4.2.4	HPLC s reverzní fází.....	25
4.2.5	Izolace bakteriální DNA.....	26
4.2.6	PCR-DGGE metoda.....	26
4.2.6.1	PCR.....	26
4.2.6.2	DGGE.....	28
5	Výsledky a diskuse.....	30
5.1	Optimalizace extrakce flavonoidů.....	30
5.2	Analýza inkubačních směsí.....	34
5.3	Vliv myricetinu na diverzitu populací fekálních bakterií.....	36
6	Souhrn.....	41
7	Seznam literatury.....	42

1 Seznam zkratek

AAD	„antibiotic-associated diarrhea“; průjemové onemocnění spojené s antibiotiky
APS	persíran amonný
BHI	„brain-heart infusion“; infuze mozkové a srdeční tkáně
DGGE	„denaturing gradient gel electrophoresis“; elektroforéza v denaturačním gradientovém gelu
O-DMA	<i>O</i> -desmethylangolensin
GIT	gastrointestinální trakt
HPLC	„high-performance liquid chromatography“; vysokoučinná kapalinová chromatografie
McD.	McDougallův pufr
PCR	„polymerase chain reaction“; polymerasová řetězová reakce
TAE	tris-acetátový pufr
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
SCFAs	„short-chain fatty acids“; mastné kyseliny s krátkým řetězcem
TFA	„trifluoroacetic acid“; trifluoroctová kyselina
RPM	„revolutions per minute“; otáčky za minutu

2 Úvod

2.1 Střevní mikroflóra

Mikroflóra je popisována jako společenství mikroorganismů, které osidluje specifické prostředí, jedná-li se o mikroflóru určitého organismu např. člověka, rozumí se specifickým prostředím nejenom prostor uvnitř těla ale taktéž i jeho povrch například kůže [1]. Do mikroflóry patří bakterie, viry, archea a některá jednobuněčná eukaryota [2]. Nejvíce bakterií je situováno právě v tlustém střevě, celkové množství v lidském těle je pak 10^{14} buněk, což je přibližně stejně nebo až desetkrát více než počet buněk v lidském těle, pokud se jako buňky nepočítají červené krvinky, které jsou bezjaderné [3].

Symbiotický vztah mezi hostitelem a bakteriemi byl dlouhou dobu považován spíše za komensální, tedy že jeden partner z koexistence má prospěch a druhého jejich vztah nikterak neovlivňuje, než jako mutualistický, jež je popisován jakožto vztah prospěšný oběma partnerům, nicméně je známo mnoho případů, kdy některé bakterie poskytují svými metabolickými procesy pro hostitele důležité látky, což vede k závěru, že vztah mezi člověkem a bakteriemi je i mutualistický [4].

2.1.1 Složení střevní mikroflóry

Člověk se rodí jako sterilní jedinec, co se týče osídlení bakterií. Jeho mikroflóra se začíná budovat hned po narození a liší se podle druhu porodu a krmení v raném věku jedince. Při porodu císařským řezem je v počátku variabilita a zastoupení bakterií nižší než při přirozeném porodu, kdy dochází ke kontaktu dítěte s vaginální mikroflórou matky. Mikroflóra se liší i mezi novorozenci, kteří byli kojeni a těmi, kteří dostávali umělou výživu [5]. Do jednoho roku života je mikroflóra narozeného jedince vysoce proměnlivá, s postupujícím věkem je více komplexní a variabilní mezi jednotlivci a taktéž stabilnější [2]. Stabilita osídlení bakterií závisí na několika faktorech. Jeden z hlavních faktorů je strava jedince, se kterou se do těla mohou některé mikroorganismy dostat, nebo naopak může eliminovat některé bakterie jako např. strava bohatá na tuky a jednoduché cukry [6].

Střevní mikroflóra obsahuje více než 1000 různých bakteriálních druhů [7]. Značné procento střevních bakterií není možné kultivovat, jelikož nejsou dostupné kultivační podmínky (anaerobní prostředí, definované složení kultivačního média atd.), které jsou pro dané druhy bakterií zásadní, proto se pro jejich identifikaci začaly využívat genetické

metody založené na sekvenování části bakteriální ribosomální RNA, konkrétně 16S rRNA, která je specifická pro daný druh bakterií [8].

2.1.1.1 Typy bakterií střevní mikroflóry

Bakterie střevní mikroflóry jsou z velké části anaerobní, avšak nalézají se zde i fakultativně anaerobní druhy. Mezi dominantní kultivovatelné bakterie dospělých jedinců se řadí rod *Bacteriodes*, *Eubacterium*, *Coprococcus*, *Ruminococcus*, *Clostridium* a *Bifidobacterium* [9]. Nekultivovatelné bakterie byly odhaleny až v pozdějších dobách, kdy se začaly pro identifikaci bakteriálních druhů kromě kultivování a mikroskopie využívat molekulárně biologické metody, mezi něž se řadí například metoda PCR (z anglického „polymerase chain reaction“ v překladu polymerasová řetězová reakce) zahrnující rovněž elektroforézu v denaturačním gradientovém gelu, zkráceně DGGE (z anglického „denaturing gradient gel electrophoresis“) [10].

2.1.2 Funkce střevní mikroflóry

Jelikož střevní mikroflóra obsahuje tak velké množství bakterií, není možné ignorovat její vliv na zdravotní stav hostitelského organismu. Mikrobiota produkuje enzymy, které participují při syntéze některých vitamínů důležitých pro člověka. Střevní mikroflóra syntetizuje vitamin K, který je podstatný kofaktor při syntéze protrombinu podílející se na srážení krve; syntetizují též biotin, vitamin B₁₂, thiamin a kyselinu listovou [11]. Jsou zapojeny do fermentace člověku nestravitelné vlákniny (inulinu, tzv. rezistentního škrobu a některých oligosacharidů), kterou transformují na mastné kyseliny s krátkým řetězcem (zkráceně SCFAs z anglického „short-chain fatty acids“) například na acetát, propionát a butyrát, jež mohou být důležitým zdrojem energie pro střevní enterocyty [12]. SCFAs, ve větší míře butyrát, interagují se specifickými povrchovými SCFA receptory ve střevech, které regulují zánětlivé a rakovinové procesy ve střevě, alergické reakce, centrální nervový systém a kardiovaskulární systém. Proto je možné tyto receptory interagující se SCFAs označit za potenciální místo terapeutického zásahu vedoucího k udržení stálosti prostředí střev, složení střevních bakterií a následně celkového zdraví [13]. Ve výčtu pozitivních vlivů střevních bakterií nelze opomenout účast zejména *Bacteroides intestinalis* a dále také *Bacteroides fragilis* a *Escherichia coli* na biotransformaci žlučových kyselin, díky čemuž se podílí na trávení lipidů a metabolismu cholesterolu [14]. Negativně mikroflóra působí na lidi, kteří nedokáží v důsledku chybějící střevní laktasy (enzym katalyzující štěpení

laktosy obsažené například v mléku) štěpit laktosu. Ve střevech následně dochází k mikrobiální fermentaci nevyužité laktosy, což způsobuje u lidí plynatost a průjem [15].

2.2 Vliv střevní mikroflóry na metabolismus cizorodých látek

V minulosti nebylo na riziko vlivu střevní mikroflóry na metabolické procesy související s léčivy a dalšími cizorodými látkami brán velký zřetel. Roku 1993 bylo zaznamenáno 18 úmrtí lidí v Japonsku, kdy na trh byla uvedeno protivirové orálně užívané léčivo sorivudin. Následně bylo shledáno, že je střevní mikroflórou metabolizováno na 5-(2-bromvinyl)uracil. Pacienti, kteří společně se sorivudinem požívali protirakovinové léčivo obsahující 5-fluorouracil s názvem Tegafur, po přibližně 40 dnech zemřeli. Metabolit sorivudinu inhiboval metabolismus 5-fluorouracilu, který se kumuloval a překročil toxickou hladinu [16]. Tento případ vyvolal zájem o studium vlivu střevní mikroflóry na metabolismus cizorodých látek.

Hlavním typem metabolické reakce způsobené střevní mikroflórou je redukce v důsledku anaerobního prostředí ve střevech. Patří sem například redukce dvojné vazby, azoskupiny, nitroskupiny a sulfínylové skupiny. Další hlavní reakcí je hydrolýza [17]. Těmito procesy mohou vznikat aktivní metabolity s nežádoucími vedlejšími účinky. Reduktivní metabolismus látek může usnadňovat anaerobní respiraci tím, že dochází k přenosu elektronu na alternativní akceptory, které jsou k dispozici pro anaerobní respiraci. Hydrolýza naopak umožňuje tvorbu látek, které jsou využity pro růst bakterií [18].

Metabolismus cizorodých látek závisí na řadě faktorů jak na dostupnosti látky střevními bakteriím, tak na hostitelském organismu. Mezi další faktory patří např. způsob expozice – tedy zda jsou bakterie cizorodé látky vystaveny jednorázově či naopak chronicky, a tudíž dochází k tvorbě nových metabolických cest pro jeho degradaci. I forma podání léčiva, jak bylo popsáno v roce 1984 v práci [19] v případě antikoagulační látky acenocoumarol, rozhoduje o metabolismu střevními bakteriemi. Pokud byl acenocoumarol podán ve formě prášku v kapsli, byl metabolizován. Naopak při podání v roztoku nebyla přeměněna zaznamenána, jelikož došlo k rychlejší sekreci z těla.

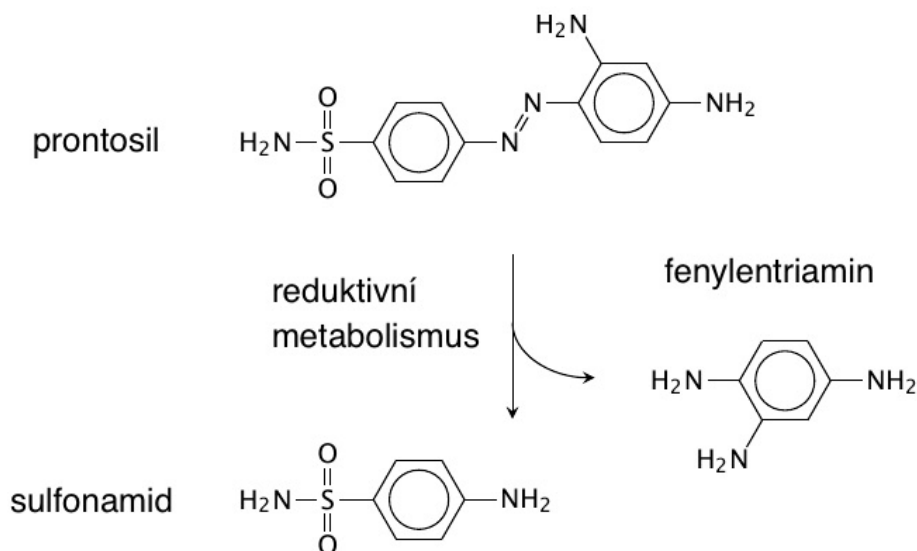
Jednou z možností, jak potlačit metabolický vliv mikroorganismů žijících ve střevech na léčiva, je jeho podání nitrožilně. Při tomto způsobu podání nedochází k přímému kontaktu léčiva s mikroflórou v gastrointestinální traktu (GIT) jako u orálního podání [20]. Není to však naprosté oddělení od kontaktu s mikroorganismy, protože se léčivo může dostat

z krve žlučovodem do GIT nebo efluxním mechanismem do GIT [21], což je ochranný mechanismus před vstupem léčiv a toxických látek do organismu [22].

Vzhledem k velkému počtu sloučenin, které jsou střevní mikroflórou metabolizovány, budou v následujících podkapitolách zmíněná pouze některá léčiva a látky vyskytující se v přírodě.

2.2.1 Redukční reakce mikrobiální biotransformace

Jednou z prvních látek, u které se zjistil vliv mikroorganismů na její aktivitu byl prontosil a neoprontosil, což jsou antibakteriální léčiva patřící do skupiny sulfonamidů. Působením mikrobiální azoreduktasy se tato léčiva metabolizují na aktivní sulfonamid, jemuž se připisují antibakteriální vlastnosti. V metabolické přeměně dochází k redukci azoskupiny viz. Obrázek 1 [23].



Obrázek 1. Reduktivní metabolická reakce prontosilu střevními bakteriemi pomocí enzymu azoreduktasy za vzniku sulfonamid a fenylentriamin. Staženo z internetu a upraveno [24]

Tento typ redukce způsobený mikroorganismy ve střevech byl popsán taktéž u sulfasalazinu v roce 1972 na potkanech, kdy dochází k redukci azoskupiny za vzniku aktivního metabolitu 5-aminosalicylové kyseliny a sulfapyridinu, který je možnou příčinou některých nežádoucích vedlejších účinků (např. bolest hlavy, závratě, nechutenství a kožní vyrážka) při aplikaci tohoto léku při léčbě zánětlivého onemocnění střev [23]. Bylo prokázáno, že podobně se metabolizuje i proléčivo balsalazid na 5-aminosalicylovou kyselinu a 4-aminobenzoyl- β -alanin a olsalazin, jež je metabolizován na dvě molekuly 5-aminosalicylové kyseliny. U nich nebyly zaznamenány žádné nežádoucí účinky [25,26].

2.2.2 Hydrolytické reakce mikrobiální biotransformace

Hydrolytické reakce, jak už bylo zmíněno výše, využívají bakterie hlavně pro získání látek pro buněčný růst. V těchto reakcích participuje celá řada hydrolytických enzymů. Mezi nejznámější enzymy, které ovlivňují metabolismus xenobiotik v těle, patří β -glukuronidasa. Aby mohlo dojít k detoxikaci látek, musí dojít k jejich biotransformaci. Xenobiotika jsou konjugována pomocí UDP-glukuronosyltransferasy s kyselinou glukuronovou, což zvyšuje jejich hydrofilitu a urychluje exkreci z těla [27]. Některé mikroorganismy jsou schopné využít své enzymové vybavení a hydrolyzou odštěpit glukuronát, který nadále využijí pro svůj buněčný růst. Xenobiotikum se stává opět více lipofilní a je následně absorbováno znovu do těla enterohepatickým oběhem. Tento efekt nemusí být jen negativní. Hydrolytické reakce, v nichž participuje β -glukuronidasa a další hydrolytické enzymy, jsou prospěšné pro zvyšování biologické aktivity přírodních látek, jak bylo prokázáno ve studii [28] na několika glykosidech flavonoidů např. rutinu, daidzinu a puerarinu. Metabolická aktivita těchto flavonoidů byla vyšší po mikrobiální přeměně, než byla před stykem se střevní mikroflórou. Do hydrolytických reakcí mikrobiální biotransformace patří rovněž dehydroxylace, deacetylace, proteolýza, dekonjugace a mnoho dalších [17].

2.3 Vliv xenobiotik na složení mikroflóry

Mezi látky, které ovlivňují složení střevní mikroflóry, se řadí hlavně antibiotická léčiva, která byla vyvinuta s cílem usmrtit či zabránit růstu patogenním bakteriím. Ve studii [29], kde byl zkoumán na pacientech vliv léčby antibiotikem amoxicilin na lidskou střevní mikroflóru, bylo potvrzeno, že při léčbě došlo ke změnám ve složení mikroorganismů v intestinální traktu, které vedly k průjemovému onemocnění spojené s antibiotiky, zkráceně AAD. AAD bylo zapříčiněno tím, že byly léčbou antibiotiky eliminovány mikroorganismy štěpící člověkem neštěpitelnou vlákninu na SCFAs, které potlačují AAD. Antibiotika mohou i zvýšit počet některých mikroorganismů, jak bylo zjištěno ve studii [30], kde antibiotikum ampicilin zvýšilo zastoupení kmenu *Bacteroidetes*. Autoři studie rovněž zjistili, že některé léky a antibiotika po interakci s mikroflórou mění genovou expresi střevních mikroorganismů [30].

2.4 Experimentální modely pro studium mikrobiálního metabolismu léčiv

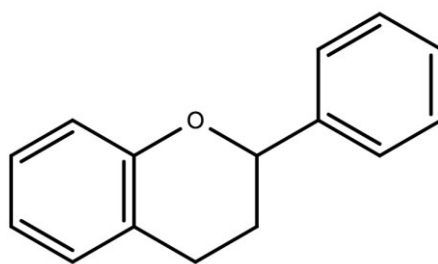
Pro studium působení střevní mikroflóry na metabolismus léčiv se často využívají takzvaná gnotobiotická zvířata, u nichž je známo složení jejich mikroflóry. Lze použít i axenická (v anglickém jazyce „germ-free“) zvířata, která se rodí bez osídlení mikroorganismy. Mimo jiné je možné použít pokusná zvířata, jež byla léčena antibiotiky, potlačující výskyt některých mikroorganismů, ta se však nehodí pro dlouhodobější experimenty. Metabolismus léčiv lze studovat pomocí mikroorganismů ve fekáliích inkubovaných ve vhodném živném médiu [31]. Protože se populace mikroorganismů ve fekáliích a v různých částích střeva často liší, nelze zaručit objektivnost takto provedených experimentů [32], mimo jiné složení mikroorganismů se odlišuje i mezi jedinci, jak bylo popsáno výše.

2.5 Flavonoidy a jejich mikrobiální metabolismus

V potravě jsou přijímány nejrůznější cizorodé látky, které podléhají mikrobiální přeměně. Mezi nejpočetnější skupinu cizorodých látek v rostlinné potravě se řadí flavonoidy.

2.5.1 Flavonoidy

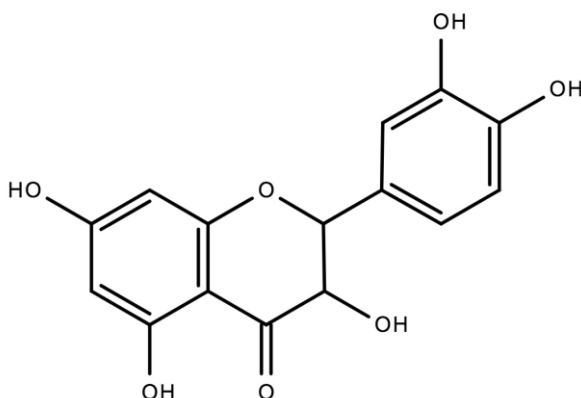
Flavonoidy jsou fenolické sloučeniny přirozeně se vyskytují v rostlinách jakožto sekundární metabolity. Je známo přes 9000 různých flavonoidů [33]. Základní strukturou flavonoidů je flavanový skelet (Obrázek 2 na následující stránce), systematicky 2-fenyl-1,4-benzopyron, jenž obsahuje 15 atomů uhlíků tvořící 3 kruhy. Flavonoidy se liší stupněm hydroxylace a druhem a pozicí substituentů na jednotlivých kruzích flavanového skeletu. Dle těchto strukturních odlišností se dělí na flavony, isoflavony, flavanony, flavonoly, flavanoly, flavanonoly, a antokyanidiny. V rostlinách se flavonoidy vyskytují v glykosylované formě. Většina flavonoidních látek se řadí mezi silné antioxidanty [34].



Obrázek 2. Flavanový skelet.

2.5.2 Mikrobiální přeměny flavonoidních látek

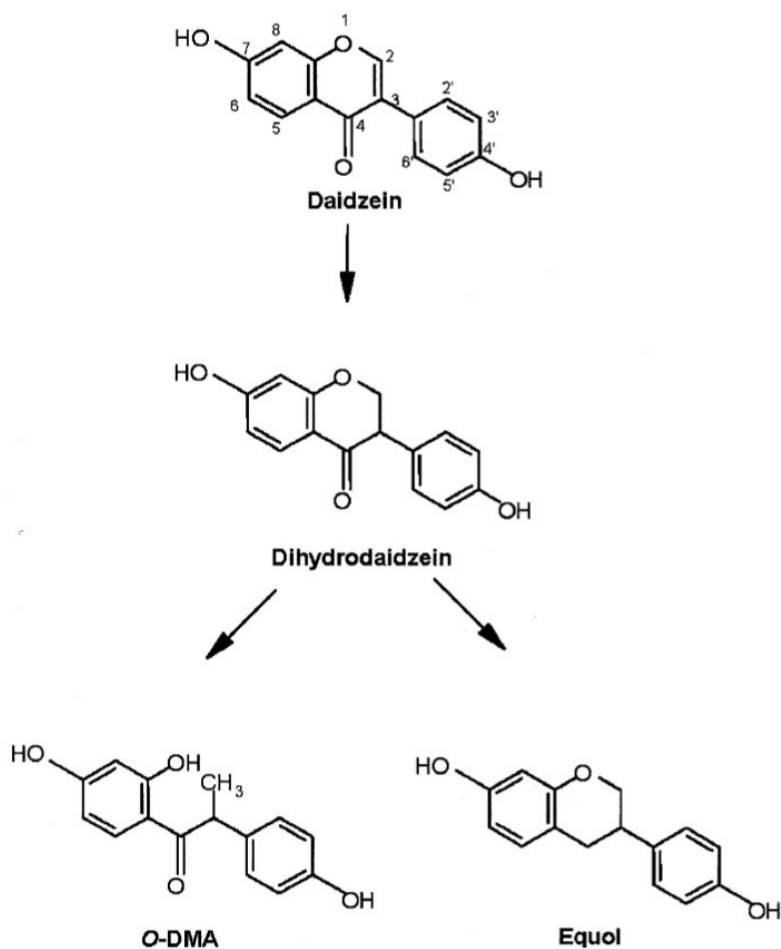
Mezi přírodní látky, které jsou mikroorganismy přeměňovány a u nichž byl metabolismus prozkoumán, patří quercetin (struktura na Obrázku 3), flavonoid přirozeně se vyskytující v ovoci, zelenině a některých bylinách [35]. Často se vyskytuje jako většina flavonoidů vázaný na cukernou složku, konkrétně na rutinosu jakožto rutin nebo glukosu a tvoří tak isoquercetin.



Obrázek 3. Struktura quercetinu.

Bylo prokázáno, že quercetin po orálním podání je i jako jiné flavonoidy z části degradován za vzniku různých fenolických kyselin [36]. Rovněž bylo pozorováno na gnotobiotických potkanech, kteří byli osídleni bakteriemi *Eubacterium ramulus* a *Enerococcus casseliflavus* vyskytující se přirozeně v lidském střevě, že dokáží oba druhy isoquercetin deglykosylovat a poté degradovat. Jelikož je *Eubacterium ramulus* široce rozšířen v lidském střevě, je považován za významného zástupce v metabolismu flavonoidů [37]. V roce 2014 bylo zjištěno, že schopnost degradovat quercetin mají i další bakterie, z nichž *Clostridium perfringens* a *Bacteroides fragilis* mají největší kapacitu k degradaci quercetinu [38].

Dalším flavonoidem, konkrétně isoflavonoid obsažený v sóje, u kterého lze poukázat na metabolismus střevními bakteriemi je daidzein viz Obrázek 4. V práci [39] byl proveden pokus na potkanech, jimž byla podána orálně dávka daidzeinu a také i jejich fekálie byly kultivované v anaerobním prostředí s daidzeinem. Pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) bylo zjištěno, že daidzein je metabolizován na dihydrodaidzein a následně na metabolity, které již nebylo možno detekovat pomocí HPLC. Při zkoumání metabolismu daidzeinu na 6 dobrovolnících, kteří poskytli vzorky fekálií, byl sledován vznik rozdílných metabolitů jak mezi vzorky jedinců, tak mezi vzorky téhož jedince získanými v různých časech. Buď došlo k tvorbě dihydrodaidzeinu a equolu (u dvou vzorků) či pouze k tvorbě dihydrodaidzeinu (u jednoho vzorku) anebo naopak nebyl daidzein nijak metabolizován u jednoho z šesti dobrovolníků a při analýze fekálií bylo naměřeno stejné množství daidzeinu. U posledního vzorku došlo k tvorbě equolu a *O*-desmethylangolensinu (*O*-DMA) [40]. Struktura všech vzniklých metabolitů je na Obrázku 4.

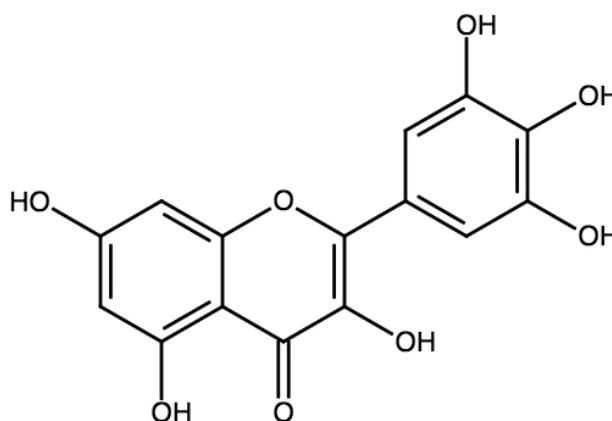


Obrázek 4. Struktura daidzeinu a jeho metabolitů dihydrodaidzeinu, *O*-desmethylangolensinu (*O*-DMA) a equolu. Staženo z internetu [40].

Dalšími flavonoidy, které budou uvedeny v této části úvodu jsou myricetin a dihydromyricetin, jejichž vzájemná přeměna je studována v této bakalářské práci.

2.5.3 Myricetin

Myricetin (sumární vzorec: $C_{15}H_{12}O_8$; strukturální vzorec: Obrázek 5; $M_r = 318,237$ g/mol) je flavonoid se systematickým názvem 3,5,7-trihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyfenyl)-1-benzopyran-4-on. Jedná se o nažloutlou krystalickou látku omezeně rozpustnou ve vroucí vodě. Je považován za silný přírodní antioxidant přirozeně se vyskytující v mnoha druzích zeleniny – hrášku, mrkvi, zelí, tuřínu, květáku a česneku, ale taktéž v ovoci – jahodách, meruňkách a jablkách [41]. Myricetin byl testován jako potenciální lék na prevenci a tlumení onemocnění aterosklerózy [42]. Prokázaly se u něj taktéž protirakovinné, protizánětlivé a antimutagenní účinky [43]. Má též schopnost silně inhibovat enzym HIV-reversní transkriptasu, ale taktéž DNA polymerasu I a α a rovněž RNA polymerasu. Jedná se tudíž o eventuální přírodní antivirotikum [44].



Obrázek 5. Strukturální vzorec myricetinu.

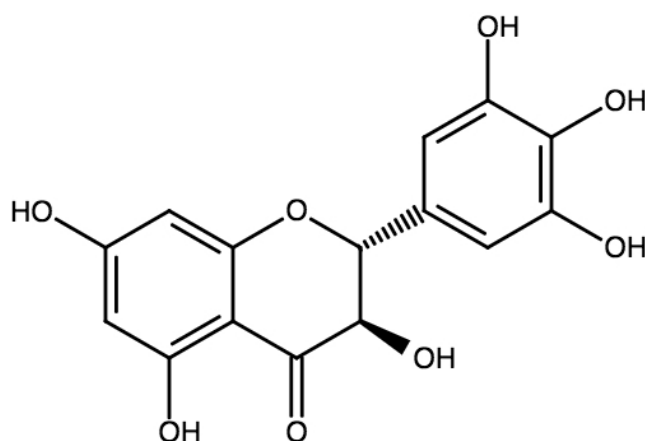
2.5.4 Dihydromyricetin

Dihydromyricetin (sumární vzorec: $C_{15}H_{12}O_8$, strukturální vzorec: Obrázek 6, $M_r = 320,252$ g/mol), jiným názvem ampelopsin, se řadí mezi flavonoidy se systematickým názvem 2,3-dihydro-3,5,7-trihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyfenyl)-1-benzopyran-4-on. Jedná se o bílou krystalickou látku. V přírodě se nachází v rostlinách *Hovenia dulcis*, *Ampelopsis* rodu *japonica*, *megalophylla* a *grossedentata*, taktéž v *Cercidiphyllum japonicum*, *Rhododendron cinnabarium* a *Cedrus doedara* [45,46]. *Hovenia dulcis* českým názvem

Dužistopka sladká se používá v tradiční čínské a korejské medicíně pro své antiparazitické, močopudné, antipyretické, hepatoprotektivní účinky a svůj vliv na metabolismus ethanolu [47].

Hepatoprotektivní účinky byli potvrzeny ve studii [48], kdy autoři studie testovali methanolvý extrakt z rostliny *Hovenia dulcis* na potkanech a myších, kterým byla aplikována dávka tetrachlormethanu nebo D-galaktosamin/lipopolysacharidu, které mají hepatotoxické účinky. Dále bylo zjištěno, že substancí, která vykazovala vysoké hepatoprotektivní účinky, byl ampelopsin, který byl získán společně s myricetinem v ethylacetátové frakci z methanolvého extraktu. Myricetin naopak nevykazoval žádné hepatoprotektivní účinky. Dihydromyricetin je potenciální lék pro léčbu alkoholismu, jelikož interaguje s GABA_A receptory v mozku, které ovlivňují působení ethanolu, taktéž působí pozitivně na vedlejší účinky po konzumaci alkoholu [49].

V práci [50] byl zkoumán metabolismus dihydromyricetinu na laboratorních potkanech, jimž byl dihydromyricetin podáván orálně. Metabolismus dihydromyricetinu byl zkoumán i na suspenzi lidských střevních bakterií v anaerobních podmínkách. Pomocí metody HPLC a hmotnostní spektrometrie bylo zjištěno 7 různých metabolitů, které vznikly několika reakcemi: dehydroxylace, methylace, glukuronidace, isomerace a redukce. Tři metabolity byly zjištěny jak ve fekáliích u potkanů, tak ve fekáliích u člověka. Tři další metabolity byly získány z moči pokusných potkanů, kteří užívali dihydromyricetin orálně.



Obrázek 6. Strukturní vzorec dihydromyricetinu.

3 Cíl práce

Střevní mikroflóra ovlivňuje velké množství metabolických procesů v hostitelském organismu. Předkládaná bakalářská práce se zaměřuje na interakce flavonoidu myricetinu s lidskou střevní mikroflórou. Cílem bakalářské práce bylo zjistit, zda je myricetin metabolicky konvertován na biologicky účinný dihydromyricetin a současně zda myricetin ovlivňuje střevní mikroflóru.

Pro studium tohoto cíle je třeba řešit následující dílčí úkoly:

- vypracovat metodiku separace myricetinu a dihydromyricetinu na HPLC
- nalézt vhodné podmínky pro extrakci myricetinu a dihydromyricetinu z inkubačních směsí
- sledovat časový průběh degradace myricetinu za anaerobních a aerobních podmínek
- inkubační metodou určit efekt myricetinu na heterogenitu lidské mikroflóry

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

4.1.1 Použité chemikálie

APIChem (Čína)

dihydromyricetin

Imuna Pharm (Česká republika)

kvasničný extrakt

J.K.Baker (USA)

methanol

Lachema Brno (Česká republika)

hydrogenfosforečnan sodný, chlorid vápenatý, chlorid draselný

Lach-Ner (Česká republika)

ethylacetát, chlorid sodný, kyselina octová 99%, síran horečnatý heptahydrát

Linde (Česká republika)

dusík, oxid uhličitý, vodík

OMEGA bio-tek (USA)

50x TAE pufr

OXOID (Anglie)

Brain Heart Infusion (BHI), AnaeroGen™ 3.5L, trypton

PENTA (Česká republika)

hydrogenuhličitan sodný

Serva (Německo)

L-cystein hydrochlorid, močovina, persíran amonný

Sigma-Aldrich (USA)

akrylamid, dimethylsulfoxid, formamid, chlorzoxazon, PCR Grade Water, REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix with MgCl₂, resazurin, SYBR Green

Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Japonsko)

myricetin

VWR Chemicals

N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED)

Zymo Research (USA)

ZR Fecal DNA MiniPrep

Kočí fekálie použité pro optimalizaci metody byly odebrány od zdravé kočky.

Lidské fekálie byly odebrány od zdravého jedince a před použitím vloženy do nádoby společně s AnaeroGen™ 3.5L pro vytvoření dočasného anaerobního prostředí.

4.1.2 Použité přístroje

Analytické váhy

Discovery, Ohaus Corp. (USA)

Automatické pipety

Eppendorf (Německo); Nichiryo (Japonsko)

Centrifugy

Mikro 22R, Hettich (Německo); HAWK 15/05, MSE (Anglie); Janetzki K23, MLW (Německo); Spectrafuge Mini Centrifuge C1301B, Labnet International, Inc. (USA); HW6C, HWLAB (Čína)

Elektroforetická aparatura

DCode™ System, Bio-Rad (USA)

HPLC systém

Agilent technologies 1200 (USA) - čtyřkanálová peristaltická pumpa 1200, 1200 automatický dávkovač ALS G1329A, 1200 vakuový degasser G1322A, zahřívač kolony LCO102, ECOM s.r.o. (Česká republika)

HPLC kolony

Nucleosil C18 100-5, Macherey- Nagel (Německo); Chromolith RP-18 E, Merck (Německo)

Injekční mikrostříkačka

MICROLITER Syringe 702RN, Hamilton (Švýcarsko)

Inkubátor

Biological Thermostat BT 120, Laboratorní přístroje Praha (Česká republika)

Laboratorní třepačka

Vortex-Genie 2, MO BIO Laboratories, Inc. (USA)

Membránová vývěva

MZ 2C NT, Vacuubrand (Německo)

Magnetická míchačka

ESP stirrer, VELP Scientifica (Itálie)

PCR cycler

TProfessional Thermocycler, Biometra (Německo); TAdvanced Basiseinheit, Biometra (Německo)

Peristaltické čerpadlo a dávkovač

PCD 21, Kouřil (Česká republika)

Předvážky

KERN EW 600-2M, Kern & Sohn GmbH, (Německo)

Ruční homogenizátor

Ultra-Turrax T 10 basic, IKA (Německo)

Vakuová pumpa

Laboport, KNF Lab (USA)

Vakuové centrifugační zahušťovací zařízení

Acid-Resistant CentriVap Concentrator, Labconco (USA)

Vortexy

Vortex-Genie 2, Scientific Industries, Inc. (USA), MS2 minishaker, IKA (USA), Vortex Mixer VX-200, Labnet (USA)

Zobrazovací zařízení pro dokumentaci gelu

Mocelular Imager[®] Gel Doc[™] XR+, Bio-Rad (USA)

Zdroj pro elektroforézu

PowerPac Basic, Bio-Rad (USA)

4.2 Metody

4.2.1 Optimalizace extrakce

4.2.1.1 Příprava zásobní suspenze

Do kádinky bylo naváženo 2,8 g kočičích fekálií a suspendováno se 7,9 g LB média (1% trypton, 0,5% kvasničný extrakt, 1% NaCl, pH 7,4). Do média bylo následně kvantitativně přidáno 2,34 mg dihydromyricetinu a 2,41 mg myricetinu. Skleněnou tyčinkou bylo vše rozmícháno na homogenní suspenzi. Suspenze byla rozdělena do devíti 5ml mikrozkušavek po 1 g suspenze. Vše bylo zamrazeno.

4.2.1.2 Extrakce za použití různých rozpouštědel

Do mikrozkušavky s 1 g alikvotu bylo přidáno 300 μ l 1mM chlorzoxazonu a 3 ml n-butanolu nebo ethylacetátu. Následně bylo vše extrahováno na Vortexu 80 s na maximálních otáčkách. Následně byly mikrozkušavky centrifugovány 10 minut při 4000 RPM (centrifuga HW6C, HWLAB s úhlovým rotorem. 6x5,0 ml) Z každé mikrozkušavky bylo odebráno 2 ml ethylacetátové či butanolové frakce. Frakce byly odpařeny na vakuovém centrifugačním zahušťovacím zařízení (Acid-Resistant CentriVap, Labconco) při 36°C (ethylacetátová frakce cca 60 minut, butanolová frakce 240 minut).

Pro zjištění vlivu pH na extraktibilitu byla extrakce ethylacetátem zopakována s přidáním 5 μ l 99% kyseliny octové nebo 6 μ l 4M NaOH k alikvotu.

Vzorky po odpařování byly následně rozpuštěny v 500 μ l methanolu a analyzovány na HPLC.

4.2.2 Aerobní a anaerobní kultivace myricetinu s fekálními bakteriemi

4.2.2.1 Příprava McDougallova pufru a BHI média

Nejprve byl připraven McDougallův (McD.) pufr dle [51] a BHI médium dle návodu od výrobce OXOID.

4.2.2.2 Příprava vzorků

Do 10 kultivačních zkumavek typu Hungate bylo anaerobně odměřeno 10 ml McD. pufru. Rovněž bylo do 10 kultivačních zkumavek aerobně odměřeno 10 ml McD. pufru. Do dalších 10 kultivačních zkumavek bylo dávkováno anaerobně po 10 ml BHI média.

Do plastové nádoby bylo naváženo 35 g stolice a přidáno 35 g dilučního roztoku, který byl připraven dle [52]. Vše bylo homogenizováno (ruční tyčový homogenizátor Ultra-Turrax T 10 basic, IKA), dokud nevznikla homogenní suspenze. Pro přípravu vzorků bez přidání myricetinu (kontrola) bylo přidáno 1,5 ml připravené suspenze do 6 kultivačních zkumavek typu Hungate – dvě aerobně s McD. pufrem, dvě anaerobně s McD. pufrem za současného zavádění plynu (plyn byl složen z 75% N₂, 25% CO₂ a 5% H₂) a dvě anaerobně s BHI médiem a jedna kultivační zkumavka od každé kultivace byla zamrazena pro čas inkubace $t = 0$ h. Do zbylého inokula (55 g) bylo přidáno 4,8 mg myricetinu (celková koncentrace 240 nmol/g). Znovu bylo vše důkladně homogenizováno. Následně bylo 1,5 ml takto připraveného inokula zaočkováno pipetou aerobně a anaerobně do kultivačních zkumavek typu Hungate s McD. pufrem nebo BHI médiem. Poté jedna kultivační zkumavka od každého typu kultivace byla zamrazena pro čas inkubace $t = 0$ h.

Zbylé kultivační zkumavky byly vloženy do inkubátoru (Biological Thermostat BT 120, Laboratorní přístroje Praha) s nastavenou teplotou inkubace 39°C. Od každého typu kultivace byla po 1, 3, 6, 10, 16 a 24 hodinách inkubace odebrána vždy jedna kultivační zkumavka a uchována při -20°C.

4.2.3 Extrakce myricetinu

Kultivační zkumavka typu Hungate se vzorkem byla rozmrazena a protřepána. Bylo odměřeno 2 ml inkubační směsi do vysoké zkumavky a zkumavka se zbylou inkubační směsí byla ihned zmrazena pro další použití. K 2 ml vzorku bylo přidáno 10 μ l 99% kyseliny octové pro úpravu pH, promícháno na Vortexu a následně přidáno mikrostříkačkou 30 μ l 1mM roztoku chlorzoxazonu, který byl použit jako vnitřní standard a znovu homogenizováno Vortexem. Následně bylo přidáno 6 ml ethylacetátu a 80 s extrahováno na Vortexu vířivou extrakcí. Centrifugací 10 minut při 4000 RPM a 10°C na centrifuze Janetzki K23 s výkyvným křížem (4x70 ml) byla separována ethylacetátová frakce, z níž byly 4 ml po částech odpařovány při 36°C na vakuovém centrifugačním zahušťovacím zařízení CentriVap (Labconco) přibližně 180 minut. Vzorky po odpaření byly rozpuštěny v 50 μ l methanolu, promíchány na Vortexu a centrifugovány 20 s (minicentrifuga SpectrafugeTM, úhlový rotor 6x2,0 ml, 6000 RPM).

4.2.4 HPLC s reverzní fází

Vzorky byly analyzovány metodou HPLC s UV-detekcí (HPLC Agilent 1200 series) na monolitické koloně Chromolith RP-18 E. HPLC systém byl sestaven z čtyřkanálové peristaltické pumpy, automatického dávkovače (ALS G1329A), vakuového degasseru (G1322A) a zahříváče kolony (LCO102, ECOM s.r.o). Metoda HPLC využívá toho, že na nepolární stacionární fázi se při separaci přechodně vážou nepolární látky a polární mobilní fáze rychleji unáší látky více polární, které se méně váží na stacionární fázi. Pro analýzu v této bakalářské práci byla využita gradientová eluce, u které je na počátku přítomna převážně vodná polární mobilní fáze s postupně narůstající koncentrací organické fáze.

Složení mobilní fáze bylo postupně optimalizováno až do konečného využití tří dílčích mobilních fází. Mobilní fáze A obsahovala 40% methanol s 0,1% trifluorovou kyselinou (TFA), mobilní fáze B 100% methanol a fáze C ultračistou vodu s 0,1% TFA. Všechny mobilní fáze byly před použitím odplyněny.

Podmínky gradientu byly dle Tabulky 1.

Tabulka 1. Složení gradientu pro HPLC.

t / min	A / %	B / %	C / %
0 – 5,5	40	0	60
6,5 – 15,5	80	0	20
16,0 – 17,5	50	50	0
18,0 – 20,0	40	0	60

Legenda: Mobilní fáze A obsahovala 40% methanol s 0,1% trifluorovou kyselinou (TFA), mobilní fáze B 100% methanol a fáze C ultračistou vodu s 0,1% TFA.

Průtok mobilní fáze byl po celou dobu měření 1,5 ml/min. Kolona byla termostatována na přibližně 34°C, teplota se však měnila slabě dle teploty laboratoře. Objem vzorku dávkovaný na kolonu byl vždy 20 µl. Analýza probíhala při tlaku přibližně 40 barů. Detekce probíhala při vlnové délce 340 nm a 280 nm. Analýza trvala 20 minut. Vyhodnocení bylo provedeno metodou vnitřního standardu. Získané výsledky byly statisticky zpracovány v programu Microsoft Office Excel 2007.

4.2.5 Izolace bakteriální DNA

Bakteriální DNA byla izolována pomocí soupravy ZR Fecal DNA MiniPrep od výrobce Zymo Research, jehož součásti jsou uvedené v následujícím textu v uvozovkách. Před začátkem práce byl „IV-HRC Spin Filter“ připraven odlomením plastové zátky ve dně, vložením do sběrné zkumavky a centrifugací (centrifuga Mikro 22R, Hettich) 3 minuty při přesně 8 000 g. Následně bylo odměřeno 150 µl vzorku z inkubační směsi do „ZR BashingBead Lysis Tube“ a přidáno 700 µl „Lysis Solution“. Zkumavka byla vložena do třepačky Vortex-Genie 2 (MO BIO Laboratories, Inc.) a třepáno 5 minut při max. rychlosti. „ZR BashingBead Lysis Tube“ byla centrifugována v mikroadstředivce 1 minutu při 10 000 g. Poté bylo přeneseno 400 µl supernatantu do „IV Spin Filter“ za odlomení plastové zátky a vše bylo vloženo do sběrací zkumavky a centrifugováno 1 minutu při 7 000 g. Do filtrátu ze sběrné zkumavky bylo přidáno 1200 µl „Fecal DNA Binding Buffer“ a lehce promícháno. Poté 800 µl vytvořené směsi bylo přeneseno do „IIC Column“ za odlomení plastové zátky a umístěno do nové sběrné zkumavky, následně centrifugováno 1 minutu při 10 000 g pro zakoncentrování DNA. Toto bylo provedeno dvakrát. Obsah ze sběrné zkumavky byl odstraněn a do „IIC Column“ umístěné v nové sběrné zkumavce bylo přidáno 200 µl „DNA Pre-Wash Buffer“ a centrifugováno při 1 minutu 10 000 g pro promytí DNA. „IIC Column“ byla přenesena do čisté 1,5ml mikrozukavky a přidáno 100 µl „DNA Elution Buffer“ přímo na matrix v koloně. Centrifugací 30 sekund při 10 000 g došlo k vymytí DNA z kolony. Vymytá DNA byla přenesena do „IV-HRC Spin Filter“ v 1,5ml mikrozukavce a stočeno 1 minutu při 8 000 g.

4.2.6 PCR-DGGE metoda

Pro analýzu vzorků na přítomné bakterie metodou PCR-DGGE byla použita metodika dle [10].

4.2.6.1 PCR

Metodu PCR vyvinul Kary Mullis v roce 1983. Při této metodě dochází k amplifikaci úseku DNA. Amplifikovaný úsek DNA je ohraničen tzv. primery, což jsou krátké oligonukleotidové řetězce. Amplifikace pak probíhá replikačním principem, přičemž vznikne obrovské množství kopií daného úseku DNA. Klasická PCR metoda se využívá pro kvalitativní analýzu.

Bylo potřeba amplifikovat úsek DNA, který kóduje 16S rRNA přítomných bakterií. Do 200 μ l mikrozkušavky byly odměřeny složky reakční směsi pro PCR dle Tabulky 2.

Tabulka 2. Složky reakční směsi pro PCR.

Složka reakční směsi	V / μ l
izolát DNA	1
„forward“ primer 338GC	1
„reverse“ primer 534RP	1
PCR mix	15
PCR H ₂ O	12

Legenda: PCR H₂O a PCR mix byl od výrobce Sigma-Aldrich. PCR mix obsahuje Tris-HCl, KCl, MgCl₂, želatínu, dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), stabilizátory a *Taq* DNA Polymerasu. „Forward“ a „Reverse“ primer byl připraven ze zásobního 100 μ M roztoku 10x zředěním sterilní vodou.

Mikrozkušavka byla následně vložena do PCR cycleru TAdvanced Basiseinheit (Biometra).

Metoda PCR je složena z několika na sebe navazujících kroků charakterizovaných určitou teplotou a časem. V této bakalářské práci se sestávala z kroků dle Tabulky 3 na následující stránce.

Tabulka 3. Časové a teplotní podmínky jednotlivých kroků PCR metody pro amplifikaci úseku DNA.

Krok	t	T / °C
1	5 min	95,0
2	30 s	95,0
3	20 s	61,0
4	40 s	72,0
5	5 min	72,0
6	30 min	8,0

Legenda: Krok 2-4 byl opakován 34x. Nejdříve dochází při teplotě 95°C k denaturaci DNA, následně snížením teploty na 61°C dojde k nasednutí primeru na denaturaci vzniklou jednovláknovou DNA a poté při teplotě 72°C k elongaci nových řetězců. Kroky denaturace, hybridizace a elongace se opakují pro amplifikaci daného úseku DNA. Následně dojde ke zchlazení na teplotu 8°C.

4.2.6.2 DGGE

Separace oligonukleotidových řetězců v denaturačním gradientovém gelu je založena na elektroforetické pohyblivosti částečně roztavené molekuly DNA v polyakrylamidovém gelu. Amplifikované části DNA putují v elektrickém poli rychlostí, která odpovídá jejich molekulové hmotnosti, se zvyšující se koncentrací denaturačních látek v gelu (močoviny a formamidu) dochází k oddělení řetězců a denaturaci DNA [10]. Nevýhodou této techniky je fakt, že některé fylogeneticky nesourodé sekvence se mohou chovat obdobně a tudíž zaujímat při separaci stejnou pozici v gelu [53]. Další nevýhodou je míra detekce, kdy se díky nízké senzitivitě nemusí zachytit některé bakteriální druhy, které jsou v mikrobiální směsi v menší míře [54].

Pro analýzu amplifikované bakteriální DNA bylo potřeba připravit gel s denaturační silou v rozmezí 35-60%. Denaturační síla se mění v závislosti na koncentraci formamidu a močoviny v polymeračních roztocích. Pro přípravu roztoků o dané denaturační síle byly použity chemikálie o množství daném v Tabulce 4 na následující stránce.

Tabulka 4. Složky denaturačního polyakrylamidového gelu.

Denaturační síla	35%	60%
40% akrylamid (ml)	5,560	5,560
50x tris-acetátový (TAE) pufr (ml)	0,500	0,500
formamid (ml)	3,500	6,000
močovina (g)	3,765	6,300
deionizovaná H ₂ O (ml)	12,250	9,500

Legenda: Množství složek pro získání denaturační síly gelu 35% a 60%. Denaturační síla se mění v závislosti na koncentraci formamidu a močoviny v polymeračních roztocích.

Byla sestavena DGGE aparatura s šířkou „spaceru“ 1 mm. Připravené polymerační roztoky byly nality do systému spojených nádob. Jehla výpustě od systému spojených nádob byla vložena mezi odmaštěná skla elektroforetické aparatury. Se zapnutým mícháním bylo do obou nádob s připravenými roztoky přidáno 20 μ l TEMEDu a 200 μ l 10% APS pro zahájení polymerace. Nádoby byly spojeny a čerpadlo zapnuto. Elektroforetická aparatura byla naplněna polymeračními roztoky a vložen „hřeben“ pro vytvoření 25 vzorkových jamek. Gel byl ponechán přibližně 45 minut polymerovat.

Mezitím byl připraven 1x TAE pufr o objemu 7 l naředěním 50x koncentrovaného zásobního roztoku destilovanou vodou. Takto připravený pufr byl nalit do elektroforetické vany a nechán vyhřívat na 60°C. Po polymeraci byl vytažen „hřeben“ z gelu a taktéž i bočnice se sklem a gelem ze stojanu a nasazeny do vnitřní části DGGE aparatury. Následně byly vytvořené jamky propláchnuty pufrům a nanesen standard a 30 μ l od každého vzorku. Aparatura byla připojena ke zdroji napětí, pokud během pipetování vzorků klesla teplota pufru pod 60°C, bylo nastaveno napětí 30 V. Po vyrovnání teploty na 60°C bylo nastaveno napětí na 55 V a elektroforéza ponechána probíhat přibližně 18 hodin.

Po skončení elektroforézy byl gel barven v 50 ml 1x TAE pufru s 5 μ l interkalační barvy SYBR Green 20 minut za míchání. Následně byl gel fotograficky zdokumentován pomocí „Mocelular Imager® Gel Doc™ XR+“ od výrobce Bio-Rad.

5 Výsledky a diskuse

Předkládaná bakalářská práce se zabývá interakcí střevní mikroflóry s flavonoidem myricetinem a jeho potenciální přeměnu na dihydromyricetin střevními mikroorganismy.

5.1 Optimalizace extrakce flavonoidů

Pro analýzu bylo nejprve nutné optimalizovat postup extrakce flavonoidů ze vzorku biologické matrice. Optimalizace extrakce dihydromyricetinu a myricetinu byla provedena na kočičích fekáliích resuspendovaných v LB médiu. Pro extrakci byl použit n-butanol, který vyhovoval autorům v práci [50] při extrakci dihydromyricetinu a jeho metabolitů. Pro extrakci byl následně testován námi navržený ethylacetát jako extrakční činidlo. Chlorzoxazon byl v této práci používán jako vnitřní standard. Výsledky extrakce jsou shrnuty v Tabulce 5.

Tabulka 5. Výsledky extrakce myricetinu, dihydromyricetinu a chlorzoxazonu.

sloučenina	extrakční činidlo	
	ethylacetát	n-butanol
	a.u.	
myricetin	8969	1280
dihydromyricetin	12124	8027
chlorzoxazon	1740	1871

Legenda: Hodnoty jsou plochami pod křivkami jednotlivých analytů vyjádřené pomocí a.u.. Analýza proběhla metodou HPLC na koloně Nucleosil C18 100-5 (izokratická eluce, mobilní fáze: 60% MeOH + 0,05% H₃PO₄) při průtoku 0,6 ml/min, tlaku 130 barů a vlnové délce 370 nm pro myricetin a 290 nm pro dihydromyricetin a chlorzoxazon.

Při extrakci byl nejvhodnějším extrakčním činidlem ethylacetát. Extrakční schopnost n-butanolu nebyla tak vysoká v porovnání s ethylacetátem. Při použití n-butanolu byly ze vzorku extrahovány i látky, které interferovaly při analýze, rovněž doba odpařování n-butanolu byla delší než u ethylacetátu.

Před extrakcí byla do vzorku přidána kyselina octová, která zvýšila množství extrahovaného myricetinu a dihydromyricetinu ze vzorku. Naopak při použití NaOH byla výtěžnost extrakce mnohem nižší než při použití kyseliny octové viz Tabulka 6.

Tabulka 6. Výsledky extrakce myricetinu, dihydromyricetinu a chlorzoxazonu.

Sloučenina	kyselina octová	NaOH
	a.u.	
myricetin	15704	8299
dihydromyricetin	14674	7123
chlorzoxazon	2088	1783

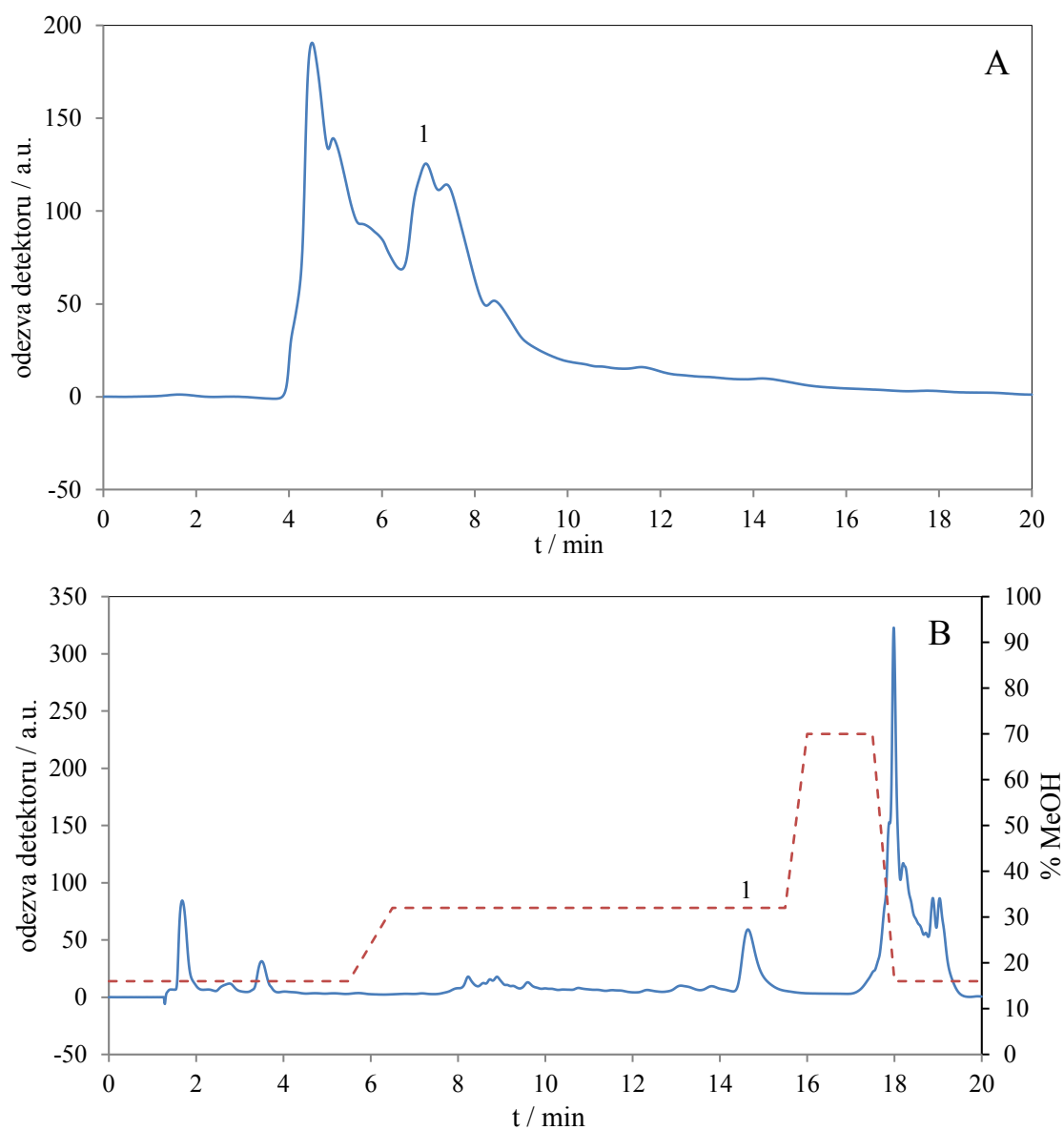
Legenda: Hodnoty jsou plochami pod křivkami jednotlivých analytů vyjádřené pomocí a.u.. Analýza proběhla metodou HPLC na koloně Nucleosil C18 100-5 (izokratická eluce, mobilní fáze: 60% MeOH + 0,05% H₃PO₄) při průtoku 0,6 ml/min, tlaku 130 barů a vlnové délce 370 nm pro myricetin a 290 nm pro dihydromyricetin a chlorzoxazon.

Z Tabulky 6 je patrné, že extraktibilita chlorzoxazonu se v kyselém a v zásaditém prostředí zásadně nemění. Vliv pH byl pozorován v případě obou flavonoidů, jejichž extraktibilita v kyselém prostředí byla téměř dvojnásobná oproti zásaditému prostředí. Důvodem je nejspíše fakt, že v kyselém prostředí jsou tyto látky neionizované, tudíž přechod extrahované látky do nepolárního rozpouštědla je dle teorie extrakce kapalina-kapalina snazší. Myricetin a dihydromyricetin mají navíc z důvodu počtu hydroxyskupin v jejich struktuře kyselý charakter. Rozdíl mezi extrakcí v kyselém a zásaditém prostředí byl sledován i na barvě ethylacetátové frakce po extrakci. V zásaditém prostředí měla frakce barvu světle žlutou, naopak v kyselém prostředí byla frakce tmavší.

Byla též porovnávána účinnost extrakce n-butanolem, který byl použit v práci [50] a ethylacetátem v kyselém prostředí, který byl použit v této bakalářské práci. Účinnost extrakce ethylacetátem v kyselém prostředí byla pro dihydromyricetin 38%, myricetin 31% a chlorzoxazon 68%. Účinnost extrakce n-butanolem byla naopak nízká pro dihydromyricetin 21%, myricetin méně jak 3% a chlorzoxazon 61%. Pro kvantifikaci myricetinu tedy není n-butanol nejlepším extrakčním činidlem. Naopak účinnost extrakce chlorzoxazonu byla podobná při použití obou extrakčních činidel.

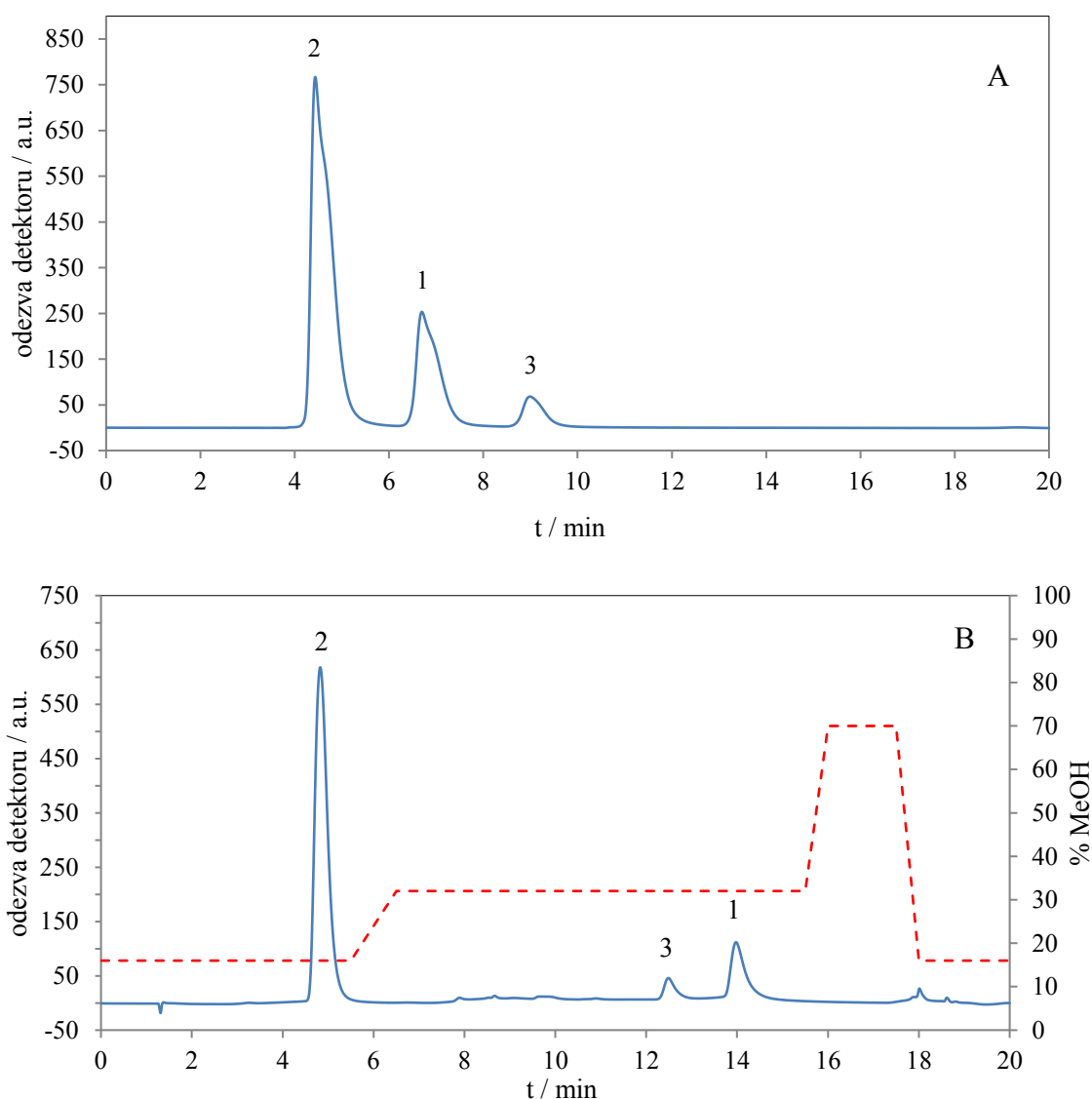
Pro analýzu pomocí HPLC byla nejprve použita kolona Nucleosil C18 100-5. Ta však nevykazovala dostatečnou separační kapacitu, která byla potřeba pro vyhodnocení množství myricetinu a jeho metabolitu. Z tohoto důvodu bylo měření následně prováděno na monolitické koloně Chromolith RP-18 E, u níž byla pozorována vyšší separační

schopnost hlavně při gradientové eluci, která byla pro tuto analýzu optimalizována. Porovnání separace na těchto dvou kolonách je na Obrázku 7.



Obrázek 7. HPLC separace extraktů. Chromatogram A patří k analýze na koloně Nucleosil C18 100-5 (izokratická eluce, průtok 0,6 ml/min, tlak 130 barů, mobilní fáze: 60% MeOH + 0,05% H₃PO₄) inkubační směsi získané kultivací (t=0 h) myricetinu v BHI médiu s lidskými fekálními bakteriemi. Chromatogram B patří k analýze stejného vzorku na monolitické koloně Chromolith RP-18 E (gradientová eluce, průtok 1,5 ml/min, tlak 40 barů, mobilní fáze A: 40% methanol + 0,1% TFA, mobilní fáze B: 100% methanol, mobilní fáze C: ultračistá voda + 0,1% TFA). Červenou přerušovanou čarou je vyznačen obsah methanolu v mobilní fázi. Vrchol označený číslem 1 patří myricetinu. Detekce probíhala při vlnové délce 340 nm.

Na Obrázku 8 je dále porovnání chromatogramů ze separace směsi myricetinu, dihydromyricetinu a chlorzoxazonu na jednotlivých kolonách při vlnové délce 290 nm, při které absorbují všechny látky.

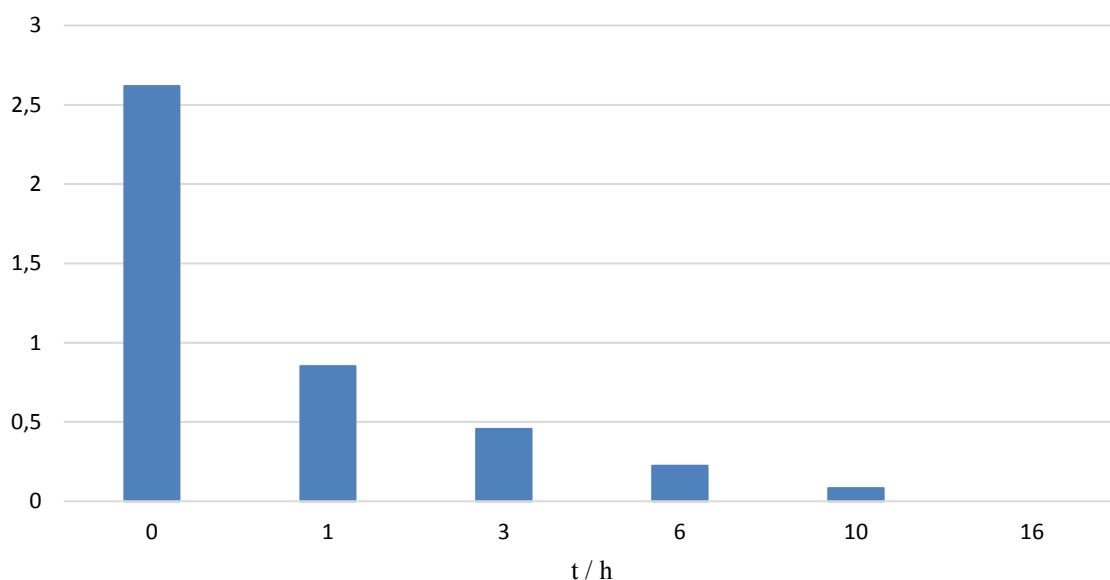


Obrázek 8. Chromatogram A patří k analýze na koloně Nucleosil C18 100-5 (izokratická eluce, průtok 0,6 ml/min, tlak 130 barů, mobilní fáze: 60% MeOH + 0,05% H₃PO₄) směsi 0,8mM myricetinu (1), 0,8mM dihydromyricetinu (2) a 0,4mM chlorzoxazonu (3). Chromatogram B patří k analýze směsi (0,7mM dihydromyricetin, 0,3mM myricetin a 0,3mM chlorzoxazon) na monolitické koloně Chromolith RP-18 E (gradientová eluce, průtok 1,5 ml/min, tlak 40 barů, mobilní fáze A: 40% methanol + 0,1% TFA, mobilní fáze B: 100% methanol, mobilní fáze C: ultračistá voda + 0,1% TFA). Červenou přerušovanou čarou je vyznačen obsah methanolu v mobilní fázi. Detekce probíhala při vlnové délce 290 nm. Retenční časy jednotlivých látek byly na chromatogramu A pro dihydromyricetin 4,4 min, myricetin 6,7 min a chlorzoxazon 9,0 min a na chromatogramu B pro dihydromyricetin 4,8 min, chlorzoxazon 12,5 min a myricetin 14,0 min.

5.2 Analýza inkubačních směsí

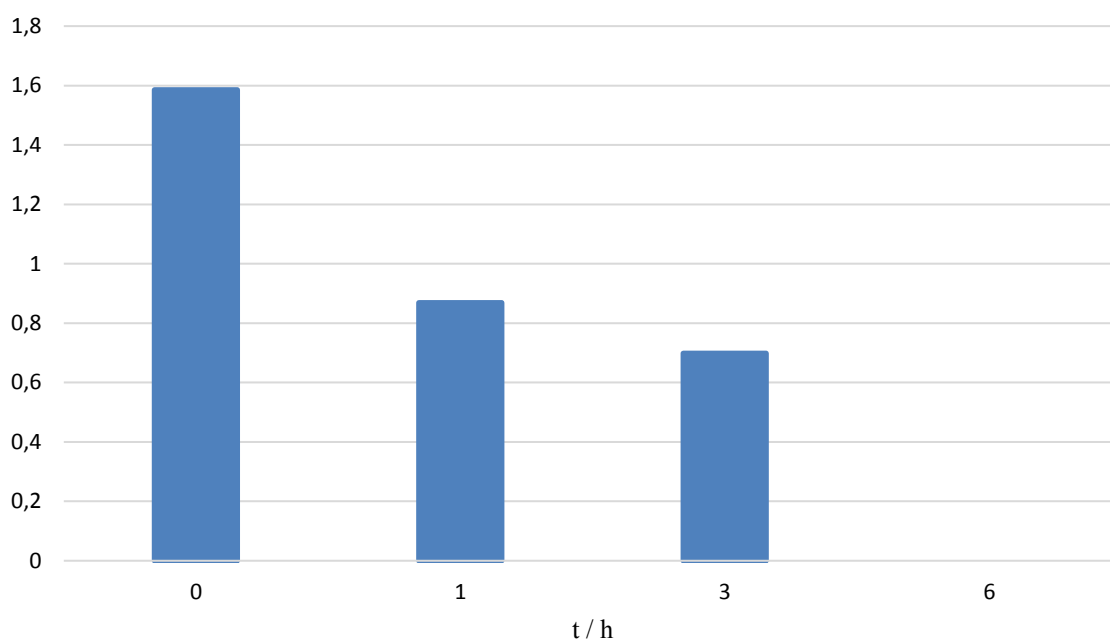
Nejprve byla sledována inkubace vzorku s fekálními bakteriemi s myricetinem jak v McD. pufru, tak v BHI médiu v průběhu 72 hodin. Analýzou pomocí HPLC bylo zjištěno, že při kultivaci lidských fekálních bakterií v McD. pufru za aerobních i anaerobních podmínek byl myricetin degradován do 24 hodin. Stejný výsledek byl zaznamenán i u kultivace v BHI médiu za anaerobních podmínek. Po analýze všech vzorků nebyl nalezen žádný „pík“ odpovídající dihydromyricetinu jako případného metabolitu myricetinu.

Dále byla provedena 24hodinová inkubace, kdy kultivace byly ukončovány po 1, 3, 6, 10, 16 a 24 hodinách. Po extrakci a analýze všech vzorků kultivovaných v McD. pufru anaerobně bylo zjištěno, že myricetin je téměř degradován po 10 hodinách, jak je patrné z Obrázku 9.



Obrázek 9. Časová závislost degradace myricetinu. Myricetin byl inkubován se vzorkem lidských fekálií 1, 3, 6, 10 a 16 hodin v McD. pufru za anaerobních podmínek a po následné extrakci ethylacetátem analyzován metodou HPLC. Množství myricetinu je vyjádřeno relativně vůči vnitřnímu standardu chlorzoxazonu. Analýza metodou HPLC proběhla na monolitické koloně Chromolith RP-18 E (gradientová eluce, průtok 1,5 ml/min, tlak 40 barů, mobilní fáze A: 40% methanol + 0,1% TFA, mobilní fáze B: 100% methanol, mobilní fáze C: ultračistá voda + 0,1% TFA. Detekce probíhala 20 minut při vlnové délce 340 nm.

Z výsledků analýz, kdy byl myricetin inkubován společně s fekálními bakteriemi v BHI médiu v anaerobních podmínkách, vyplývá, že k degradaci myricetinu došlo již za 3 hodiny (Obrázek 10).



Obrázek 10. Časová závislost degradace myricetinu. Myricetin byl inkubován se vzorkem lidských fekálií 1, 3 a 6 hodin v BHI médiu za anaerobních podmínek a po následné extrakci ethylacetátem analyzován metodou HPLC. Množství myricetinu je vyjádřeno relativně vůči vnitřnímu standardu chlorzoxazonu. Analýza metodou HPLC proběhla na monolitické koloně Chromolith RP-18 E (gradientová eluce, průtok 1,5 ml/min, tlak 40 barů, mobilní fáze A: 40% methanol + 0,1% TFA, mobilní fáze B: 100% methanol, mobilní fáze C: ultračistá voda + 0,1% TFA. Detekce probíhala 20 minut při vlnové délce 340 nm.

Rychlost degradace myricetinu střevními bakteriemi byla po kultivaci v BHI médiu téměř dvojnásobná. Jelikož BHI médium je bohatým zdrojem důležitých látek pro bakteriální růst, došlo zřejmě při inkubaci k namnožení fekálních bakterií, a tedy myricetin mohlo degradovat více bakterií než u vzorků kultivovaných v McD. pufru, který nebyl bohatý na živiny. Po analýze všech inkubačních směsí s BHI médiem nebyl nalezen žádný vrchol, který by patřil dihydromyricetinu.

Pro úplnost byla degradace myricetinu sledována též v inkubačních směsích kultivovaných za aerobních podmínek v McD. pufru. V tomto případě došlo k degradaci myricetinu po 3 hodinách. Tento výsledek značí, že myricetin degradují i fakultativně aerobní bakterie přítomné ve vzorku lidské střevní mikroflóry.

Již z těchto výsledků je patrné, že metabolismus myricetinu střevní mikroflórou je velmi rychlý. Je třeba i poukázat na fakt, že fekální bakterie jsou schopné degradovat sloučeninu, která je ve vodném prostředí jen omezeně rozpustná. Po analýze metodou HPLC nebyla shledána přítomnost dihydromyricetinu ani v jednom vzorku připravovaném za anaerobních podmínek, což značí, že dihydromyricetin není metabolitem myricetinu. V případě myricetinu tedy nedochází k tvorbě redukovaného metabolitu, jak je tomu při přeměně daidzeinu fekálními bakteriemi potkanů na dihydrodaidzein [39].

Výsledek, že myricetin v této bakalářské práci nebyl fekální mikroflórou metabolizován na dihydromyricetin, zatím nelze zobecnit. Existuje mnoho faktorů, které silně ovlivňují metabolismus cizorodých látek, jako např. strava, četnost a různorodost bakterií ve střevech a i to, z jaké části střev byly bakterie pro analýzu použity. Jak už bylo uvedeno výše, zastoupení bakterií v různých částí střev je odlišné a proto ve vzorku stolice nejsou zastoupené všechny bakterie ze střev [32].

Pokud by tento experiment byl prováděn na fekáliích od více lidí, je velmi pravděpodobné, že z myricetinu by bylo možné detekovat jak dihydromyricetin, tak různé jiné metabolity, což bylo pozorováno právě u daidzeinu [40], jehož metabolismus byl zkoumán na šesti dobrovolnících. Redukovaný metabolit daidzeinu, dihydrodaidzein, byl nalezen u 3 z 6 dobrovolníků. U ostatních byly detekovány jiné metabolity daidzeinu nebo daidzein nebyl nijak metabolizován.

Možnými metabolity myricetinu, které nemohly být získány v ethylacetátové frakci z důvodu své polaritě, a tudíž ani zachyceny metodou HPLC, jsou fenolické kyseliny. Ty byly detekovány ve studii [55], kde byl zkoumán metabolismus několika flavonoidů např. quercetinu lidskými fekálními bakteriemi. Pro získání fenolických kyselin by však bylo třeba použít pro extrakci polární rozpouštědlo jako např. methanol.

5.3 Vliv myricetinu na diverzitu populací fekálních bakterií

Po izolaci bakteriální DNA z jednotlivých inkubačních směsí byl pomocí PCR metody amplifikován úsek DNA, který kóduje 16S rRNA. Získaný PCR produkt byl následně separován na denaturačních gradientovém polyakryamidovém gelu. Na obrázku 11 na následující stránce jsou znázorněny výsledky separace PCR produktů získaných z inkubačních směsí, které byly kultivovány po dobu 24, 48 a 72 hodin.



Obrázek 11. Separace PCR produktů na denaturačním gradientovém polyakrylamidovém gelu. Na DDGE profilu jsou separace PCR produktů z inkubačních směsí kultivovaných 72 hodin s myricetinem anaerobně v McD. pufru (1), anaerobně v BHI médiu (2) a bez myricetinu (kontrola) anaerobně v McD. pufru (3), aerobně v McD. pufru (4) a anaerobně v BHI médiu (11); následně ze 48hodinové inkubace s myricetinem anaerobně v BHI médiu (7), anaerobně v McD. pufru (8) a aerobně v McD. pufru (9); poté z 24hodinové inkubace s myricetinem anaerobně v BHI médiu (5), aerobně v McD. pufru (6) a anaerobně v McD. pufru (10).

Při porovnání fragmentů PCR produktu z inkubační směsi kultivované 72 hodin v McD. pufru bez přidání myricetinu (3) a PCR produktu inkubační směsi po 72 hodinách inkubace v McD. pufru s přidaným myricetinem (1) v anaerobních podmínkách (viz Obrázek 11) je patrné více fragmentů u dráhy 3 ve střední části gelu než u dráhy 1, což by odpovídalo inhibici růstu některých kmenů bakterií. Zóny některých fragmentů v dráze 1 jsou intenzivnější než u 3, což značí stimulaci růstů těchto kmenů bakterií.

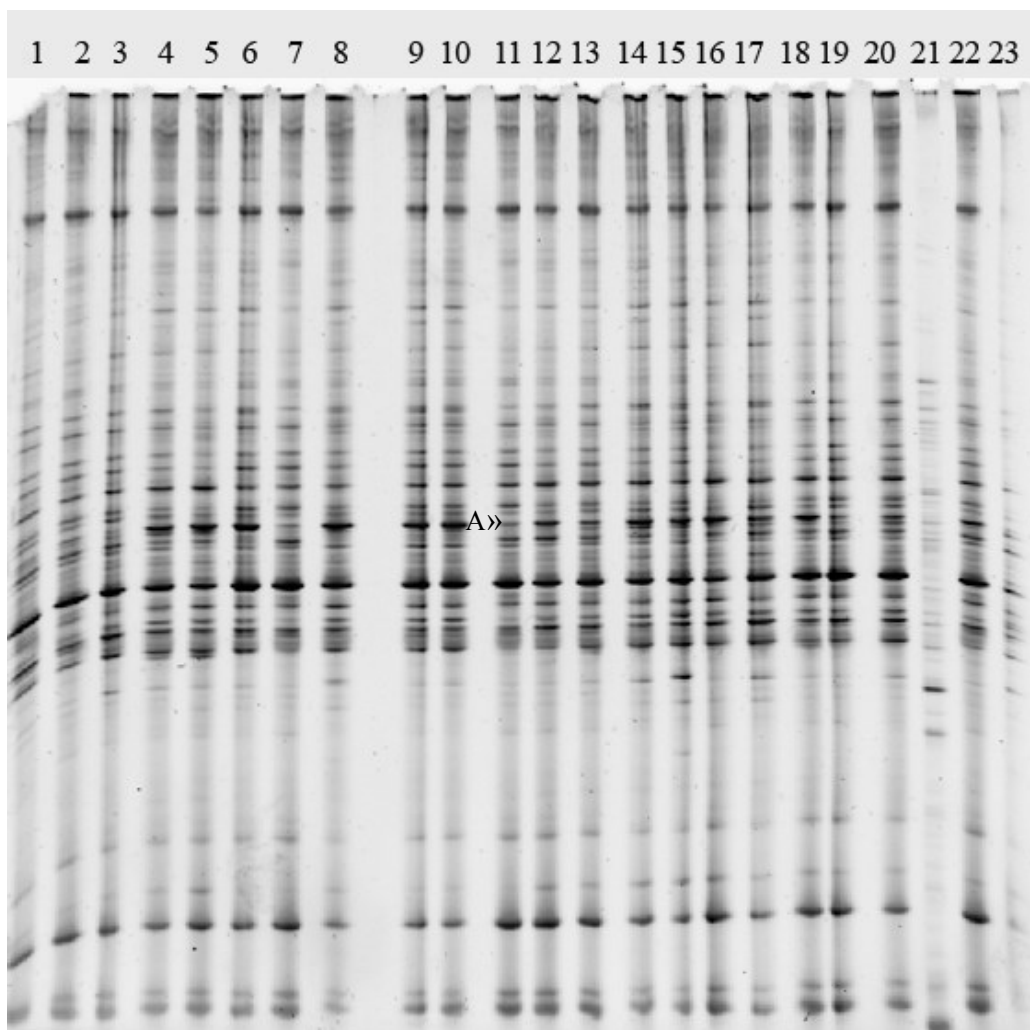
Při porovnání drah separace PCR produktů z inkubačních směsí kultivovaných 72 hodin anaerobně v BHI médiu s přídavkem (2) a bez přídavku (11) myricetinu, byly některé fragmenty slabší, jiné naopak silnější. Tento fakt souvisí taktéž pravděpodobně

s bohatostí BHI média na živiny, tedy ač došlo k degradaci myricetinu fekálními bakteriemi v BHI médiu, nebyla změna tak znatelná jako u porovnání drah separace PCR produktů z inkubačních směsí kultivovaných 72 hodin anaerobně v McD. pufru, jelikož pro svůj růst mohly využít médium bohaté na živiny.

Podobné výsledky byly zaznamenány ve studii [56], kde byl testován vliv quercetinu, katechinu a puerarinu na růst lidských fekálních bakterií a následně na jejich energetický metabolismus. Bylo zjištěno že tyto flavonoidy významně inhibovaly růst bakterií z kmene *Bacteroidetes* a *Firmicutes* naopak bakterie patřící do kmene *Aktinobakterie* vykazovaly stimulaci růstu. Také i v této studii je možné zjistit, že některé fragmenty jsou po expozici myricetinem silnější než jiné. Možným důvodem nízké intenzity zón fragmentů, jejichž PCR produkty byly získány z inkubačních směsí s McD. pufrem může být, že kmen bakterií, z nichž byla izolovaná DNA, neměl pro svůj růst vyhovující podmínky, tedy negativní ovlivnění jejich růstu může souviset s nedostatkem živin v McD. pufru.

Z Obrázku 11 na předchozí stránce je také patrný vliv aerobního a anaerobního prostředí na růst fekálních bakterií. Při porovnání drah 7, 8 a 9 je zastoupení zón fragmentů odlišné. Při pohledu na dráhu 9 jsou některé fragmenty silnější než u 8. Jelikož se ve střevech vyskytují i fakultativně aerobní bakterie, došlo k jejich nárůstu v důsledku aerobního prostředí, nejspíše při aerobním prostředí mohou využít enzymový aparát zajišťující energeticky výhodnější degradaci živných látek.

Následně byla provedena separace PCR produktů inkubačních směsí kultivovaných 1, 3, 6, 10, 16 a 24 hodin (Obrázek 12 na následující stránce).



Obrázek 12. Separace PCR produktů na denaturačním gradientovém polyakrylamidovém gelu. Na DGGE profilu jsou separace PCR produktů z inkubačních směsí kultivovaných 24 hodin s myricetinem anaerobně v McD. pufru (22), aerobně v McD. pufru (5), anaerobně v BHI médiu (21) a bez myricetinu (kontrola) anaerobně v McD. pufru (12), aerobně v McD. pufru (16) a anaerobně v BHI médiu (23); následně z 16h inkubace s myricetinem anaerobně v McD. pufru (11), aerobně v McD. pufru (18) a anaerobně v BHI médiu (15). Vzorky z 10h inkubace s myricetinem anaerobně v McD. pufru (7), aerobně v McD. pufru (4) a anaerobně v BHI médiu (8). Vzorky z 6h inkubace s myricetinem anaerobně v McD. pufru (2), aerobně v McD. pufru (13), anaerobně v BHI médiu (9), Vzorky z 6h inkubace kultivovaných s 10x větším množstvím myricetinu anaerobně v McD. pufru (19), aerobně v McD. pufru (14) a anaerobně v BHI médiu (10). Dále vzorky z 3h inkubace s myricetinem anaerobně v McD. pufru (1), aerobně v McD. pufru (20) a anaerobně v BHI médiu (6) a následně vzorky s myricetinem, které po inokulaci anaerobně v McD. pufru (3) a aerobně v McD. pufru (17) byly ihned zamrazeny. Označený fragment A značí zónu, jejichž optická intenzita se s délkou inkubace vzorku lidských fekálií s myricetinem mění.

Při porovnání fragmentů PCR produktů z inkubačních směsí kultivovaných 24 hodin v McD. pufru bez přidání myricetinu a PCR produktů inkubačních směsí po 24 hodinách inkubace v McD. pufru s přidaným myricetinem v anaerobních a aerobních podmínkách nebyla zaznamenána žádná změna optické intenzity zón fragmentů. Co se týče inkubačních směsí kultivovaných v BHI médiu (dráha 21 a 23) zde je viditelná změna u dráhy 23, kde jsou ve střední části fragmenty intenzivnější. Tento fakt může souviset s nedostatečnou amplifikací požadovaného úseku DNA, který kóduje 16S rRNA, jelikož optická intenzita je na rozdíl od ostatních drah celkově nižší. Rozdíl v intenzitě je možné pozorovat na fragmentu A, který je u PCR produktu z inkubační směsi kultivované anaerobně se zvyšujícím se časem inkubace silnější, avšak při porovnání stejného fragmentu na kontrolním vzorku 12 (bez přidání myricetinu), intenzita tohoto fragmentu je také vysoká. Toto zvýšení intenzity tedy nemusí souviset s expozicí tohoto kmene bakterie myricetinem. Pokud byly fekální bakterie vystaveny 10x většímu množství myricetinu nebyl po 6 hodinách inkubace znatelný rozdíl u PCR produktů inkubovaných anaerobně v McD. pufru (19) i BHI médiu (10) oproti separacím, kde byly fekální bakterie vystaveny standardnímu množství myricetinu (na Obrázku 12 na předchozí stránce dráha 2 a 9).

Více změn, co se týče potenciálního vlivu myricetinu na růst bakterií, bylo zaznamenáno při delší inkubaci myricetinu s fekálními bakteriemi tedy 48 a 72 hodin (Obrázek 11 na straně 37). Celkově tedy myricetin ovlivňuje růst některých kmenů bakterií ať už negativně či pozitivně v delším časovém horizontu expozice.

6 Souhrn

V této bakalářské práci byly studovány interakce střevní mikroflóry s flavonoidem myricetinem a jeho potenciální přeměna na dihydromyricetin působením fekálních bakterií z člověka.

Výsledky získané v této práci lze shrnout následovně:

1. Ethylacetát s kyselinou octovou použitou pro úpravu pH byl shledán jako nejvhodnější extrakční činidlo pro získání myricetinu a dihydromyricetinu z biologického vzorku.
2. Byla úspěšně optimalizována metoda HPLC pro separaci myricetinu a dihydromyricetinu extrahovaných z kočičích fekálií.
3. Lidské fekální bakterie v této práci nemetabolizovaly myricetin na dihydromyricetin.
4. Myricetin byl fekálními bakteriemi v McD. pufru za anaerobních podmínek degradován po 10 hodinách, za aerobních po 3 hodinách a v BHI mediu za anaerobních podmínek rovněž po 3 hodinách.
5. Působením myricetinu na fekální bakterie došlo ke změnám v zastoupení izolovaných kmenů jak k inhibici, tak stimulaci růstu.

7 Seznam literatury

1. Grice, E.A., Kong, H.H., Conlan, S., Deming, C.B., Davis, J., Young, A.C., NISC Comparative Sequencing Program, Bouffard, G.G., Blakesley, R.W., Murray, P.R., Green, E.D., Turner, M.L., Segre, J.A. (2009) Topographical and Temporal Diversity of the Human Skin Microbiome. *Science* **324**, 1190–92.
2. D’Argenio, V., Salvatore, F. (2015) The role of the gut microbiome in the healthy adult status. *Clinica Chimica Acta* **451**, 97–102.
3. Sender, R., Fuchs, S., Milo, R. (2016) Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell* **164**, 337–40.
4. Bäckhed, F., Ley, R.E., Sonnenburg, J.L., Peterson, D.A., Gordon, J.I. (2005) Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science (New York, N.Y.)* **307**, 1915–20.
5. Azad, M.B., Konya, T., Maughan, H., Guttman, D.S., Field, C.J., Chari, R.S., Sears, M.R., Becker, A.B., Scott, J.A., Kozyrskyj, A.L., on behalf of the CHILD Study Investigators (2013) Gut microbiota of healthy Canadian infants: profiles by mode of delivery and infant diet at 4 months. *Canadian Medical Association Journal* **185**, 385–94.
6. Turnbaugh, P.J., Ridaura, V.K., Faith, J.J., Rey, F.E., Knight, R., Gordon, J.I. (2009) The Effect of Diet on the Human Gut Microbiome: A Metagenomic Analysis in Humanized Gnotobiotic Mice. *Science Translational Medicine* **1**.
7. Human Microbiome Project Consortium (2012) Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* **486**, 207–14.
8. Suau, A., Bonnet, R., Sutren, M., Godon, J.J., Gibson, G.R., Collins, M.D., Doré, J. (1999) Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 4799–807.
9. Moore, W.E., Holdeman, L.V. (1974) Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Applied Microbiology* **27**, 961–79.

10. Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 695–700.
11. Hill, M.J. (1997) Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis: *European Journal of Cancer Prevention* **6**, 43–45.
12. den Besten, G., van Eunen, K., Groen, A.K., Venema, K., Reijngoud, D.-J., Bakker, B.M. (2013) The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of Lipid Research* **54**, 2325–40.
13. Sivaprakasam, S., Prasad, P.D., Singh, N. (2016) Benefits of short-chain fatty acids and their receptors in inflammation and carcinogenesis. *Pharmacology & Therapeutics* **164**, 144–51.
14. Fukiya, S., Arata, M., Kawashima, H., Yoshida, D., Kaneko, M., Minamida, K., Watanabe, J., Ogura, Y., Uchida, K., Itoh, K., Wada, M., Ito, S., Yokota, A. (2009) Conversion of cholic acid and chenodeoxycholic acid into their 7-oxo derivatives by *Bacteroides intestinalis* AM-1 isolated from human feces. *FEMS Microbiology Letters* **293**, 263–70.
15. Zhao, J., Fox, M., Cong, Y., Chu, H., Shang, Y., Fried, M., Dai, N. (2010) Lactose intolerance in patients with chronic functional diarrhoea: the role of small intestinal bacterial overgrowth. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* **31**, 892–900.
16. Okuda, H., Ogura, K., Kato, A., Takubo, H., Watabe, T. (1998) A possible mechanism of eighteen patient deaths caused by interactions of sorivudine, a new antiviral drug, with oral 5-fluorouracil prodrugs. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **287**, 791–99.
17. Shamat, M.A. (1993) The role of the gastrointestinal microflora in the metabolism of drugs. *International Journal of Pharmaceutics* **97**, 1–13.
18. Spanogiannopoulos, P., Bess, E.N., Carmody, R.N., Turnbaugh, P.J. (2016) The microbial pharmacists within us: a metagenomic view of xenobiotic metabolism. *Nature Reviews Microbiology* **14**, 273–87.

19. Thijssen, H.H., Baars, L.G., Hazen, M.J., Van den Bogaard, A.E. (1984) The role of the intestinal microflora in the reductive metabolism of acenocoumarol in man. *British Journal of Clinical Pharmacology* **18**, 247–49.
20. Gugler, R., Leschik, M., Dengler, H.J. (1975) Disposition of quercetin in man after single oral and intravenous doses. *European Journal of Clinical Pharmacology* **9**, 229–34.
21. Sousa, T., Paterson, R., Moore, V., Carlsson, A., Abrahamsson, B., Basit, A.W. (2008) The gastrointestinal microbiota as a site for the biotransformation of drugs. *International Journal of Pharmaceutics* **363**, 1–25.
22. Pechandová, K., Buzková, H., Slanař, O., Perlík, F. (2006) Efluxní transmembránový transportér- P-glykoprotein. *Klinická biochemie a metabolismus* **4**, 196–201.
23. Peppercorn, M.A., Goldman, P. (1972) The role of intestinal bacteria in the metabolism of salicylazosulfapyridine. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **181**, 555–62.
24. Metabolismus prontosilu střevními bakteriemi URL: <http://watcut.uwaterloo.ca/webnotes/Pharmacology/graphics/prontosil2pic-b1291.png> [Navštíveno červenec 10, 2017].
25. Chan, R.P., Pope, D.J., Gilbert, A.P., Sacra, P.J., Baron, J.H., Lennard-Jones, J.E. (1983) Studies of two novel sulfasalazine analogs, ipsalazide and balsalazide. *Digestive Diseases and Sciences* **28**, 609–15.
26. Wadworth, A.N., Fitton, A. (1991) Olsalazine: A Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and Therapeutic Potential in Inflammatory Bowel Disease. *Drugs* **41**, 647–64.
27. Ouzzine, M., Gulberti, S., Ramalanjaona, N., Magdalou, J., Fournel-Gigleux, S. (2014) The UDP-glucuronosyltransferases of the blood-brain barrier: their role in drug metabolism and detoxication. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **8**.
28. Kim, D.-H., Jung, E.-A., Sohng, I.-S., Han, J.-A., Kim, T.-H., Han, M.J. (1998) Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities. *Archives of Pharmacal Research* **21**, 17–23.

29. Young, V.B., Schmidt, T.M. (2004) Antibiotic-Associated Diarrhea Accompanied by Large-Scale Alterations in the Composition of the Fecal Microbiota. *Journal of Clinical Microbiology* **42**, 1203–6.
30. Maurice, C.F., Haiser, H.J., Turnbaugh, P.J. (2013) Xenobiotics Shape the Physiology and Gene Expression of the Active Human Gut Microbiome. *Cell* **152**, 39–50.
31. Coates, M.E., Drasar, B.S., Mallett, A.K., Rowland, I.R. (1988) Methodological considerations for the study of bacterial metabolism in *Role of the Gut Flore in Toxicity and Cancer* (Academic Press, London), 1–23.
32. Eckburg, P.B. (2005) Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science* **308**, 1635–38.
33. Xiao, Z.-P., Peng, Z.-Y., Peng, M.-J., Yan, W.-B., Ouyang, Y.-Z., Zhu, H.-L. (2011) Flavonoids Health Benefits and Their Molecular Mechanism. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **11**, 169–77.
34. Pietta, P.-G. (2000) Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products* **63**, 1035–42.
35. Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H., Katan, M.B. (1992) Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40**, 2379–83.
36. Serra, A., Macià, A., Romero, M.-P., Reguant, J., Ortega, N., Motilva, M.-J. (2012) Metabolic pathways of the colonic metabolism of flavonoids (flavonols, flavones and flavanones) and phenolic acids. *Food Chemistry* **130**, 383–93.
37. Schneider, H., Simmering, R., Hartmann, L., Pforte, H., Blaut, M. (2000) Degradation of quercetin-3-glucoside in gnotobiotic rats associated with human intestinal bacteria. *Journal of Applied Microbiology* **89**, 1027–37.
38. Zhang, Z., Peng, X., Li, S., Zhang, N., wang, Y., Wei, H. (2014) Isolation and Identification of Quercetin Degrading Bacteria from Human Fecal Microbes. *PLoS ONE* **9**.

39. Rafii, F., Jackson, L.D., Ross, I., Heinze, T.M., Lewis, S.M., Aidoo, A., Lyn-Cook, L., Manjanatha, M. (2007) Metabolism of daidzein by fecal bacteria in rats. *Comparative Medicine* **57**, 282–86.
40. Rafii, F., Davis, C., Park, M., Heinze, T.M., Beger, R.D. (2003) Variations in metabolism of the soy isoflavonoid daidzein by human intestinal microfloras from different individuals. *Archives of Microbiology* **180**, 11–16.
41. Sultana, B., Anwar, F. (2008) Flavonols (kaempferol, quercetin, myricetin) contents of selected fruits, vegetables and medicinal plants. *Food Chemistry* **108**, 879–84.
42. Lian, T.-W., Wang, L., Lo, Y.-H., Huang, I.-J., Wu, M.-J. (2008) Fisetin, morin and myricetin attenuate CD36 expression and oxLDL uptake in U937-derived macrophages. *Biochimica et Biophysica Acta* **1781**, 601–9.
43. Ong, K.C., Khoo, H.E. (1997) Biological effects of myricetin. *General Pharmacology* **29**, 121–26.
44. Ono, K., Nakane, H. (1990) Mechanisms of inhibition of various cellular DNA and RNA polymerases by several flavonoids. *Journal of Biochemistry* **108**, 609–13.
45. Zhou, J., Xie, G., Yan, X. (2011) Volume 1 Isolated Compounds A - C in *Encyclopedia of Traditional Chinese Medicines - Molecular Structures, Pharmacological Activities, Natural Sources and Applications* (Springer, Heidelberg), 123.
46. Agrawal, P.K., Agarwal, S.K., Rastogi, R.P. (1980) Dihydroflavonols from *Cedrus deodara*. *Phytochemistry* **19**, 893–96.
47. Hyun, T.K., Eom, S.H., Yu, C.Y., Roitsch, T. (2010) *Hovenia dulcis*--an Asian traditional herb. *Planta Medica* **76**, 943–49.
48. Hase, K., Ohsugi, M., Xiong, Q., Basnet, P., Kadota, S., Namba, T. (1997) Hepatoprotective effect of *Hovenia dulcis* THUNB. on experimental liver injuries induced by carbon tetrachloride or D-galactosamine/lipopolysaccharide. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **20**, 381–85.

49. Shen, Y., Lindemeyer, A.K., Gonzalez, C., Shao, X.M., Spigelman, I., Olsen, R.W., Liang, J. (2012) Dihydromyricetin As a Novel Anti-Alcohol Intoxication Medication. *Journal of Neuroscience* **32**, 390–401.
50. Zhang, Y., Que, S., Yang, X., Wang, B., Qiao, L., Zhao, Y. (2007) Isolation and identification of metabolites from dihydromyricetin. *Magnetic Resonance in Chemistry* **45**, 909–16.
51. McDougall, E.I. (1948) The composition and output of sheep's saliva. *The Biochemical Journal* **43**, 99–109.
52. Bryant, M.P., Burkey, L.A. (1953) Cultural Methods and Some Characteristics of Some of the More Numerous Groups of Bacteria in the Bovine Rumen. *Journal of Dairy Science* **36**, 205–17.
53. Muyzer, G., Smalla, K. (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* **73**, 127–41.
54. Fujimoto, C., Maeda, H., Koikeguchi, S., Takashiba, S., Nishimura, F., Arai, H., Fukui, K., Murayama, Y. (2003) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to the analysis of microbial communities of subgingival plaque: DGGE analysis for periodontal bacteria. *Journal of Periodontal Research* **38**, 440–45.
55. Parkar, S.G., Trower, T.M., Stevenson, D.E. (2013) Fecal microbial metabolism of polyphenols and its effects on human gut microbiota. *Anaerobe* **23**, 12–19.
56. Xue, B., Xie, J., Huang, J., Chen, L., Gao, L., Ou, S., Wang, Y., Peng, X. (2016) Plant polyphenols alter a pathway of energy metabolism by inhibiting fecal Bacteroidetes and Firmicutes in vitro. *Food & Function* **7**, 1501–7.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka