

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
Katedra organické chemie



Martina Hozová

ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA KVERCETINU A JEHO DERIVÁTŮ

*Bakalářská práce*

Vedoucí práce: Mgr. Jiří Vrba, Ph.D.

Olomouc, 2012

Prohlašuji, že bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pod vedením  
Mgr. Jiřího Vrby, Ph.D., s použitím uvedené literatury a experimentálních výsledků  
získaných na Ústavu lékařské chemie a biochemie v Olomouci.

V Olomouci dne .....

Martina Hozová

Mé dík patří Jiřímu Vrbovi, vedoucímu mé bakalářské práce, za ochotu, odborné vedení a trpělivost při zpracování bakalářské práce. Dále děkuji celému Ústavu lékařské chemie a biochemie za příjemné pracovní podmínky. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mým rodičům za jejich podporu během tvorby této práce a celého studia.

**Bibliografická identifikace:**

**Jméno a příjmení autora:** Martina Hozová

**Název práce:** Antioxidační aktivita kvercetinu a jeho derivátů

**Typ práce:** Bakalářská

**Studijní obor:** Bioorganická chemie B1407

**Pracoviště:** Ústav lékařské chemie a biochemie LF UP Olomouc

**Školitel:** Mgr. Jiří Vrba, Ph.D.

**Rok obhajoby práce:** 2012

**Abstrakt:** Flavonoidy jsou polyfenolové sloučeniny produkované rostlinami. Do skupiny flavonoidů patří isoflavony, flavanony, flavanoly, antokyanidiny, flavonoly a flavony. Předmětem studia byla antioxidační aktivita flavonolu kvercetinu a jeho derivátů – taxifolinu (dihydrokvercetin) a dvou kvercetinových glykosidů, rutinu (kvercetin-3-rutinosid) a isokvercitrinu (kvercetin-3-glukosid). Antiradikálová aktivita byla hodnocena jako schopnost vychytávat difenylpikrylhydrazyllový radikál (DPPH). Také byl testován účinek testovaných sloučenin na expresi genu Hmox1, který kóduje antioxidační a cytoprotektivní enzym hemoxygenasu- 1. Výsledky ukázaly, že kvercetin, rutin a isokvercitrin mají srovnatelnou schopnost vychytávat radikál DPPH, zatímco taxifolin je méně účinný. Kvercetin jako jediný ze studovaných látek významně zvyšoval expresi genu Hmox1, zatímco ostatní sloučeniny měly zanedbatelný vliv na genovou expresi Hmox1. Z uvedených výsledků vyplývá, že

studované látky mají antiradikálovou aktivitu a kvercetin může zvýšit kapacitu enzymového antioxidačního systému buňky.

**Klíčová slova:** kvercetin, glykosid, taxifolin, antioxidant, hemoxygenasa-1

**Počet stran:** 56

**Jazyk:** český

**Bibliographical identification:**

**Author's first name and surname:** Martina Hozová

**Name of study:** Antioxidant activity of quercetin and its derivatives

**Type of thesis:** Bachelor

**Department:** Bioorganic chemistry B1407

**Advisor:** Mgr. Jiří Vrba, Ph.D.

**The year of presentation:** 2012

**Abstract:** Flavonoids are natural compounds of plant origin. They include flavanones, flavanols, anthocyanidins, flavonols, flavones and isoflavones. This study is focused on the antioxidant activity of flavonol quercetin and its derivatives – taxifolin (dihydroquercetin) and two quercetin glycosides, rutin (quercetin-3-rutinoside) and isoquercitrin (quercetin-3-glucoside). The antiradical activity was evaluated as the ability to scavenge diphenylpicrylhydrazyl radical (DPPH). The effect of the tested compounds on the expression of Hmox1 gene, coding for the antioxidant and cytoprotective enzyme heme oxygenase-1, was also examined. It was found that quercetin, rutin and isoquercitrin showed similar DPPH scavenging activity while taxifolin was less active. Quercetin also significantly increased the expression of Hmox1 gene, whereas the other tested compounds had negligible effect on Hmox1 gene expression. It is concluded that the tested compounds exert antiradical activity and that quercetin may increase the capacity of the enzymatic antioxidant defense system in RAW264.7 cells.

**Keywords:** quercetin, glycoside, taxifolin, antioxidant, heme oxygenase-1

**Number of pages:** 56

**Language:** czech

## OBSAH

1. ÚVOD	10
2. TEORETICKÁ ČÁST	12
2.1 KVERCETIN A JEHO DERIVÁTY STUDOVANÉ V PRÁCI	13
2.1.1 Chemická struktura	13
2.1.2 Zdroje kvercetinu, jeho glykosidů a taxifolinu	15
2.1.3 Biologické vlastnosti kvercetinu	15
2.1.4 Antioxidační, antiradikálové, prooxidační vlastnosti	17
2.1.4.1 Antioxidační aktivita	17
2.1.4.2 Antiradikálová aktivita	17
2.1.4.3 Prooxidační vlastnosti	18
2.1.5 Biosyntéza	20
2.1.6 Metabolismus kvercetinu	23
2.1.6.1 Metabolismus kvercetinu v savčím organismu	24
2.1.6.2 Biologická dostupnost	26
2.1.7 Toxicita	28
2.1.7.1 Studie <i>in vitro</i>	28
2.1.7.2 Studie <i>in vivo</i>	28
2.2 HEMOXYGENASA	30
2.3 POPIS METOD UŽITÝCH PŘI TESTOVÁNÍ FLAVONOIDOVÝCH LÁTEK	34



2.3.1	Spektrofotometrické měření absorbance	34
2.3.2	Difenylikrylhydrazyl (DPPH)	35
2.3.2.1	DPPH metoda	35
2.3.3	Real – time PCR (RT PCR)	36
2.3.3.1	Princip RT PCR	37
2.3.3.2	Reverzní transkripce a RT PCR	37
2.3.3.3	Sondy RT PCR	38
<b>3.</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	<b>39</b>
3.1	METODY	40
3.1.1	Chemikálie	40
3.1.2	Zhášení radikálu difenylikrylhydrazylu (DPPH) studovanými flavonoidy	40
3.1.3	Kultivace buněk RAW264.7 a jejich ošetření	41
3.1.4	Reverzní transkripce a kvantitativní RT PCR	42
3.2	VÝSLEDKY	43
3.2.1	Zhášení radikálu difenylikrylhydrazylu (DPPH)	43
3.2.2	Měření vlivu kvercetinu a jeho derivátů na expresi genu Hmox1	45
<b>4.</b>	<b>ZÁVĚR A DISKUZE</b>	<b>47</b>
<b>5.</b>	<b>LITERATURA</b>	<b>49</b>

## 1. ÚVOD

Flavonoidy jsou přirozeně se vyskytující látky. Patří mezi sekundární metabolity rostlin. Jsou známé pro své antioxidační vlastnosti. Skupina flavonoidů je relativně obsáhlá a podle rozdílných substitucí na společném skeletu je dělena na flavonoly, flavony, flavanoly, flavanony, isoflavony a antokyanidiny. Tato práce se zabývala studiem flavonolů kvercetin a jeho derivátů isokvercitrinu, rutin a flavanonu taxifolinu.

Kvercetin je nejstudovanějším flavonolem, jenž je běžnou součástí lidské stravy. Vykazuje se velkým počtem prospěšných biologických vlastností. Působí příznivě proti nemocem, spojených s působením volných radikálů, jejichž účinky mohou vést ke vzniku četných onemocnění a chorobných stavů <sup>1</sup>.

Kvercetin se převážně vyskytuje v glykosylované formě, tvoří tzv.  $O$ - $\beta$ -glykosidy (isokvercitrin, rutin). Střevní bakterie mohou kvercetin metabolizovat na taxifolin. <sup>2</sup>

Kvercetin je relativně hydrofobní, a tedy může pasivně difundovat skrz biologickou membránu. Průchod membránou je ovlivněn konjugací kvercetinového aglykonu (s methylem, sulfátem, glukuronidem), z důvodu zvýšení jeho hydrofilní vlastnosti. <sup>3</sup>

Cílem předkládané bakalářské práce je podat přehled dostupných informací o vlivu studovaných flavonoidů na organismus. Popsat biosyntézu kvercetin a jeho derivátů a metabolickou cestu těchto sloučenin. V praktické části budu porovnávat

jejich antioxidační aktivitu, která bude hodnocena jako schopnost zhasět difenylpikrylhydrazylový radikál (DPPH) a budu se také zabývat jejich vlivem na expresi myšního genu Hmox1, jež kóduje antioxidační a cytoprotektivní enzym hemoxygenasu- 1.

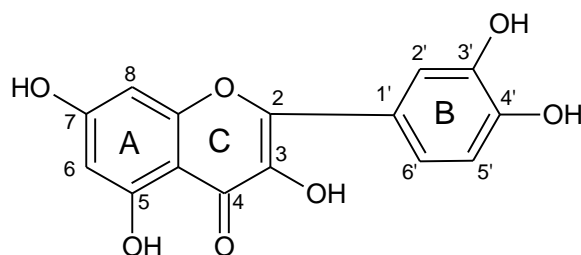
## 2. TEORETICKÁ ČÁST

## 2.1 KVERCETIN A JEHO DERIVÁTY STUDOVANÉ V PRÁCI

### 2.1.1 Chemická struktura

Flavonoidy jsou charakteristické benzo( $\gamma$ )pyronem <sup>4</sup>, který je odvozen od struktury obsahující dva benzenové kruhy (A a B, Obr. 1) spojené s heterocyklickým pyranovým nebo pyronovým kruhem (C, Obr. 1).

Podle struktury látek, lze říci, že se jedná o polyfenolové sloučeniny.

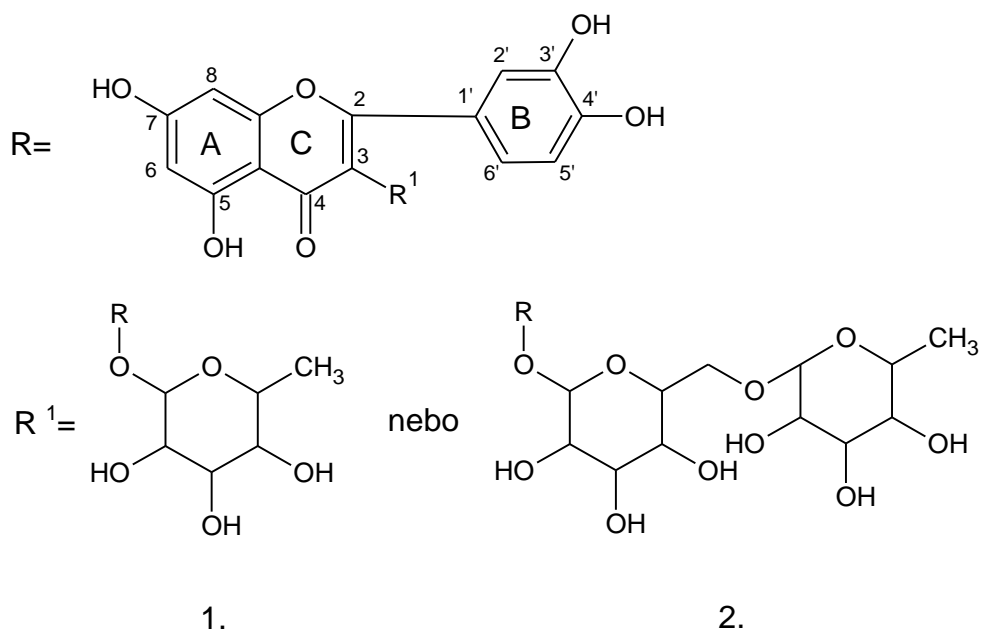


Obr. 1 Chemická struktura kvercetinu [3,3',4',5,7-pentahydroxyflavon]

Kvercetin je charakterizován hydroxylací podle schématu 3, 5, 7, 3', 4' a přítomností katecholu. Toto uspořádání je typické pro sloučeniny, jež spojujeme s antioxidační aktivitou. <sup>5</sup>

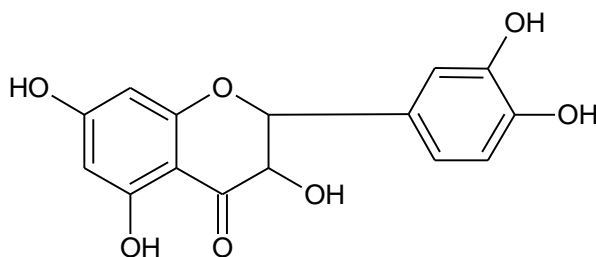
V rostlinách se flavonolový aglykon vyskytuje vázaný s cukernou složkou na 3 - pozici nenasyceného heterocyklického kruhu (Obr. 2) <sup>4</sup>. Cukerné složky (1. , 2. )

vyobrazené na Obr. 2 se pojí s kvercetinem, a tvoří tak jeho glykosidy isokvercitrin (1.) a rutin (2.).



Obr. 2 Struktura isokvercitrinu [kvercetin-3- $\beta$ -glukopyranosid] (1.) a rutinu [kvercetin-6'- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-3- $\beta$ -D-glukopyranosid] (2.)

Poslední derivát, který je studován v práci je taxifolin. Jedná se o flavanonový derivát kvercetinu. (Obr. 3)



Obr. 3 Struktura taxifolinu (dihydrokvercetin)

### 2.1.2 Zdroje kvercetinu, jeho glykosidů a taxifolinu

Kvercetin a jeho glykosidy nalezneme běžně v přírodě, v rostlinách. Kumulují se v pokožce rostlin, v listech, květech, semenech a stoncích. <sup>6</sup> Jsou ve svrchních vrstvách rostlinných orgánů, protože jejich biosyntéza je stimulována světlem. <sup>7</sup>

Vyskytují se v zelenině, v ovoci a léčivých rostlinách. Zelenina je velmi bohatým zdrojem flavonolů. Největší obsah byl zaznamenán v cibuli. Kapusta, pórek, brokolice a rajčata se vykazují menším obsahem flavonolů, avšak jejich množství není zanedbatelné. Z ovoce můžeme zmínit hrozny, borůvky, pomeranč, grapefruit. Jak bylo již dříve zjištěno, flavanony jsou sloučeniny, které se nejvíce vyskytují v citrusech. Dalším zdrojem flavonoidů je čaj, víno, kakaové boby. <sup>7, 27</sup>

Ve stravě můžeme kvercetin nalézt v cereáliích, tucích a olejích, mražených směsích a mléčných výrobcích. Také v těstovinách a obilných směsích. Žvýkačky a sladkosti mohou být také zdrojem flavonoidů - to bývá většinou dáno obsahem mentolu <sup>7, 2</sup>

### 2.1.3 Biologické vlastnosti kvercetinu

Biologické účinky jsou závislé na struktuře, protože kvercetinový aglykon má rozdílné účinky než kvercetinové konjugáty. Kvercetinové glykosidy se liší působením na organismus, což je dáno druhem připojeného cukru. <sup>8</sup>

Vykazují spoustu biologických vlastností, které jsou spojovány s antiradikálovou a antioxidační schopností flavonoidových látek. Mohou mít příznivý, ale také v menší míře škodlivý vliv na organismus, jak bylo zjištěno v několika studiích.

U rostlin mohou způsobovat pigmentaci samotných rostlin nebo ovocných plodů. Mohou působit jako atraktant pro opylující hmyz. Ovlivňují klíčivost pylu. Poskytují ochranu před UV zářením a útokem patogenů.<sup>6, 9, 10, 11</sup> Slouží jako chelatační činidla kovů škodlivých pro rostliny<sup>12</sup>.

Prospěšné působení kvercetinu na organismus se projevuje antioxidačním, antikarcinogéním, protizánětlivým, kardioprotektivním, bakteriostatickým účinkem<sup>13,14</sup>. Byl prokázán vztah mezi antioxidační aktivitou a prevencí procesu stárnutí<sup>7</sup>. Polyfenoly z červeného vína, hroznů a hroznových slupek se vykazují vasorelaxačními účinky<sup>15</sup>.

Při studiu vlivu kvercetinu na červené krvinky byly potvrzeny jeho příznivé vlastnosti. Má značnou schopnost inhibovat hemolýzu. Působením proti oxidačnímu stresu ochraňuje červené krvinky před rozpadem. Stabilizuje membrány erytrocytů redukcí lipidové peroxidace.<sup>16</sup>

Za určitých podmínek (např. v přítomnosti železnatých iontů, které lze získat degradací hemu) fenolové sloučeniny účinkují prooxidačně. Indukují poškození DNA a peroxidaci lipidů.<sup>17</sup>



## **2.1.4 Antioxidační, antiradikálové, prooxidační vlastnosti**

### **2.1.4.1 Antioxidační aktivita**

Antioxidační působení má schopnost inhibovat proces oxidace, které obvykle zahrnuje sadu různých reakcí <sup>18</sup>. Antioxidanty při malých koncentracích, a jež jsou v přítomnosti látek, na které působí svými antioxidačními účinky, mohou omezovat nebo zabraňovat destrukci těchto látek <sup>19</sup>.

Antioxidační vlastnosti jsou převážně funkcí chemické struktury. V případě kvercetinu je to dáno přítomností kruhu katecholového typu a polohou hydroxylových skupin <sup>5</sup>.

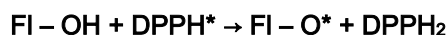
Antioxidační aktivita může být například ovlivněna koncentrací antioxidantu, oxidovaným substrátem, přítomností jiných antioxidantů, přístupem kyslíku ke vzorku, což obecně odpovídá parciálnímu tlaku kyslíku, který je daný například velikostí povrchu oxidovaného systému, chemicko – fyzikálními vlastnostmi (př. teplota, pH) a také přítomností dalších látek. <sup>20</sup>

### **2.1.4.2 Antiradikálová aktivita**

Antiradikálový účinek mají sloučeniny schopné vylákat a eliminovat volné radikály. K reakci radikálu s antiradikálem dochází v jednotlivých radikálových reakcích. <sup>18</sup>

### Radikálové reakce flavonoidů:

Průběh radikálové reakce flavonoidu (FI – OH) s radikálem DPPH, při které vznikne flavonoidový radikál a difenylpikrylhydrazin:



Pro aroxylové radikály mohou být předpokládány tři odlišné terminační reakce:

1.  $\text{FI} - \text{O}^* + \text{FI} - \text{O}^* \rightarrow \text{FI} - \text{O} - \text{O} - \text{FI}$
2.  $\text{FI} - \text{O}^* + \text{DPPH}^* \rightarrow \text{FI} - \text{O} + \text{DPPH}$
3.  $\text{FI} - \text{O}^* (\text{semichinon}) - \text{H}^* \rightarrow \text{FI} = \text{O} (\text{chinon})$

Reakce číslo 1 je spojovací reakcí mezi dvěma flavonoidovými radikály, při této reakci tedy probíhá dimerizace.

2. reakce je interakce mezi flavonoidovým a DPPH radikálem a reakce číslo 3 je alternativní a možná i převládající terminační mechanismus, který probíhá za další ztráty vodíkového atomu z flavonoidového radikálu. To podmiňuje utváření chinonu.<sup>21</sup>

#### 2.1.4.3 Prooxidační vlastnosti

Některé ze sloučenin vykazující antioxidační aktivitu mohou mít zároveň některé nežádoucí vlastnosti, např. cytotoxicitu. Ta je spojena s prooxidačním působením některých polyfenolů.<sup>6,10</sup>

Prooxidační mechanismus je zodpovědný za mutagenní aktivitu kvercetinu *in vitro*, jak bylo zjištěno v některých studiích.<sup>2</sup>

Příčinou cytotoxicity však může být i oxidace polyfenolů za vzniku semochinonů a chinonů, které jsou potenciálně cytotoxické.<sup>20</sup> Mají schopnost kovalentní vazby na DNA, proto je velmi pravděpodobné, že jsou hlavním důvodem mutagenity spojené s kvercetinem.<sup>2</sup>

Auto-oxidací flavonolu, obsahující katecholovou skupinu, mohou vznikat reaktivní kyslíkové radikály (ROS). Tento proces vede k prooxidačnímu chování flavonolových sloučenin<sup>22</sup>.

Reaktivní formy kyslíku zapříčiňují oxidační stres buněk a tím řadu onemocnění. Na druhou stranu v organismu plní řadu fyziologických funkcí, které nejsou jenom negativní. Reaktivní formy kyslíku vyvolávají například nádorové bujení, avšak také slouží k jeho kontrole a jeho případné eliminaci, což zprostředkovávají iniciací apoptósy. Proto možný prooxidační efekt *in vivo* některých flavonoidů nemusí být hodnocen jednoznačně negativně, a to také s ohledem na to, že mírný oxidační stres podněcuje zvyšování přirozené (tj. zejména enzymové) antioxidační obrany organismu a další obranné mechanismy.<sup>20</sup>

I když víme o možné prooxidační aktivitě kvercetinu, tak je velmi diskutabilní omezení jeho příjmu, jako součásti běžné stravy, jelikož jeho antioxidační vlastnosti nemohou být zanedbány. Mnoho studií prokázalo jeho prospěšné vlastnosti. Dalo by se tedy říci, že prooxidační působení nemusí být přímou hrozbou, a to také z toho důvodu, že toxické vlastnosti s mutagenními a cytotoxickými následky byly prokázány jen v *in vitro* studiích.

### 2.1.5 Biosyntéza

Cesta biosyntézy flavonoidů a její regulace byla dobře prostudována. Pro produkci rozdílných flavonoidů existuje mnoho enzymů, které jsou jednotlivým třídám charakteristické. Na Obr. 4 je popsána cesta biosyntézy kvercetinu a jeho derivátů probíhající v rajčatech.

Chalkonsyntasa postupně katalyzuje kondenzaci tří acetátových jednotek pocházejících z malonyl - CoA a 4-kumaroyl – CoA. Sekvence kódující chalkonsyntasu byly izolovány a popsány v mnoha rostlinných druzích.

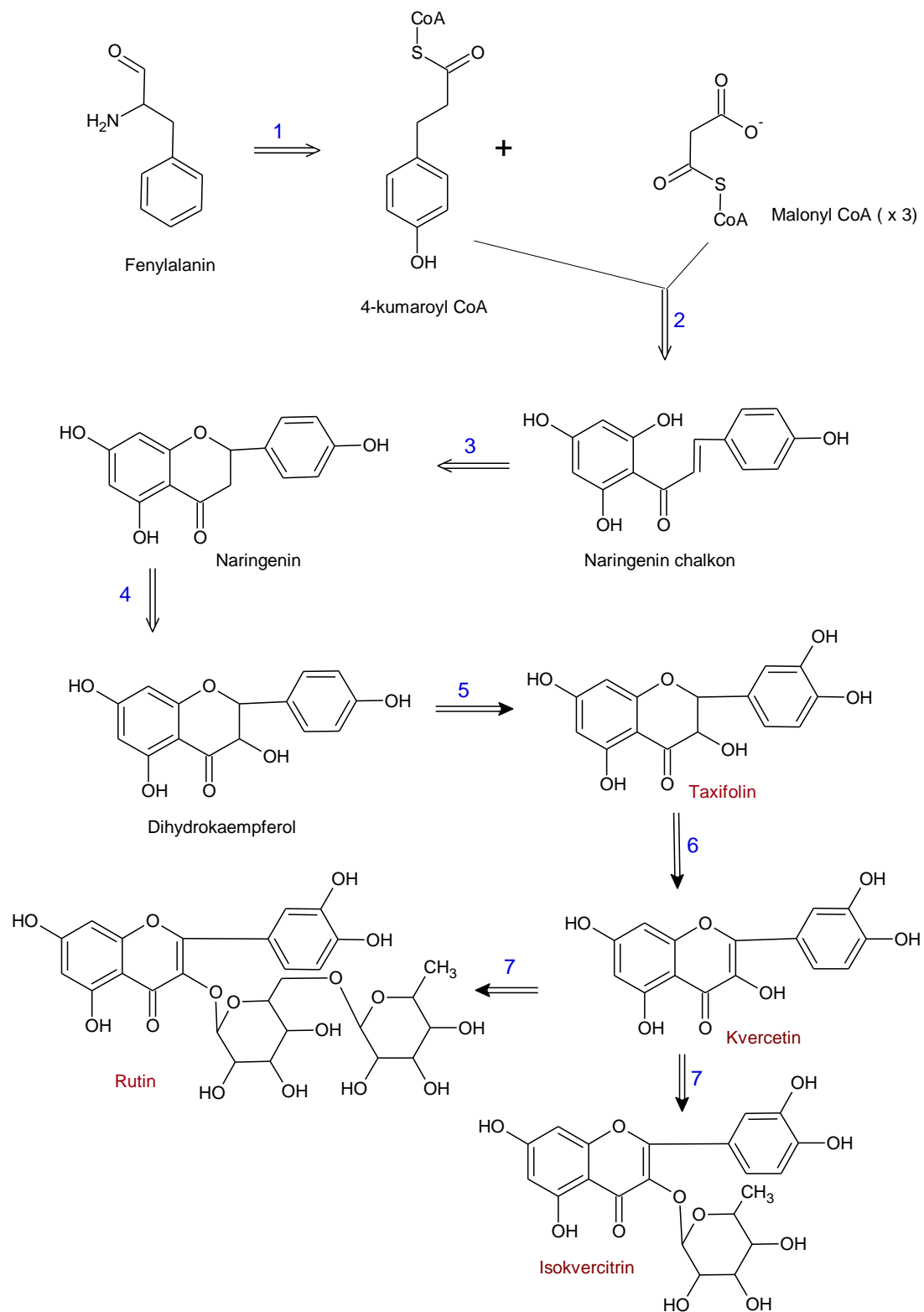
Protože většina rostlin nekumuluje chalkony, je po vytvoření naringeninového chalkonu okamžitě chalkonisomerasou přeměněn na naringeninový flavonon. Při absenci chalkonisomerasy může být chalkon spontánně isomerován na naringenin.

Následná hydroxylace flavononu probíhá na pozici C-3 heterocyklického kruhu a vzniká dihydroflavonol. Tato reakce je prováděna flavonon –3 - hydroxylasou (F3H). Dihydrokaempferol (produkt naringeninů katalyzovaného F3H) může být dále hydroxylován na pozici 3' a 5' B – kruhu (F3'H, F5'H). Tyto hydroxylace vedou k vytvoření dihydrokvercetinu (taxifolinu).

Dihydrokvercetin je převeden pomocí flavonolsyntasy na kvercetin. Tento enzym katalyzuje vznik dvojné vazby mezi uhlíkem 2 a 3 na C-kruhu.

Glukosyl/rhamnosyl transferasa katalyzuje přenos a substituci určitého cukru na kvercetin za vzniku daného glykosidu. <sup>1,9</sup>

Krok syntézy taxifolinu se dá obměnit působením flavonolsyntasy na dihydrokaempferol za vzniku kaempferolu. Přídavkem glukosyl/rhamnosyl transferasy vznikne rutin a isokvercitrin. <sup>1</sup>



1=obecný metabolismus fenylpropanoidů, 2= Chalkonsyntasa, 3=Chalkonisomerasa, 4= Flavonon-3-hydroxylasa, 5= Flavonon-3'-hydroxylasa, 6= Flavonolsyntasa, 7= Glukosyl/ Rhamnosyl transferasa

Obr. 4 Cesta biosyntézy kvercetinu a jeho glykosidů <sup>1</sup>

### 2.1.6 Metabolismus kvercetinu

Možná toxicita, stejně jako domnělý prospěšný účinek kvercetinu jsou z velké části závislé na jeho biologické dostupnosti. Cesta kvercetinu po jeho orálním podání, kterému následuje absorpce, distribuce, metabolismus a vylučování, byla rozsáhle studována jak na zvířatech, tak i na lidech. <sup>2</sup>

Antioxidanty přijímané potravou mohou působit buď přímo v gastrointestinálním traktu, nebo mohou být resorbovány do organismu. <sup>19</sup> Při jejich resorpci a následném metabolismu v játrech a ostatních tkáních dochází k přeměnám na další metabolity, jejichž biologické vlastnosti se mohou lišit. <sup>23</sup>

Ve stravě se flavonoly vyskytují vázané s cukernou složkou na 3 – pozici C – kruhu. Přes stěnu střeva však dokáže procházet pouze molekula bez glykosidu (aglykon). V tlustém střevě probíhá hydrolýza flavonoidů spojených s cukrem, což má na starosti střevní mikroflora <sup>4</sup> nebo většina polyfenolových glukosidů může být deglykosilována  $\beta$  – glukosidasou, jedná se o proces probíhající v tenkém střevě <sup>24</sup>.

Prvním krokem metabolismu zpravidla bývá odstranění cukerné složky. Odstraněním glykosidu dojde ke snížení hydrofilních vlastností, a tudíž může aglykon pasivně procházet přes střevní membránu. <sup>25</sup>

### 2.1.6.1. Metabolismu kvercetinu v savčím organismu <sup>2,7</sup> (Obr. 5) :

1. Metabolismus orálně přijatého kvercetinu začíná ve střevě.
2. Ve střevě může být kvercetin methylován. Tímto procesem se mohou získat dva produkty. Ve větší míře je tvořen isorhamnetin (1.) (3'-*O*-methylquercetin) a v menším rozsahu tamarixetin (2.) (4'-*O*-methylquercetin). Probíhá sulfatace a glukuronidace na jedné z hydroxylových skupin v buňkách střevního epitelu. V tlustém střevě je kvercetin degradován mikroflórou na jednu z několika různých fenolových kyselin (např. 3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina) a oxid uhličitý (CO<sub>2</sub>). Tento rozklad kvercetinu se označuje jako heterocyklické štěpení (Obr. 6). Ve střevě dochází také k metabolismu kvercetinu na taxifolin.
3. Absorpce nemetabolizovaného kvercetinu, (1.), (2.) a fenolových kyselin. Přes vstupní jaterní žílu se kvercetin a jeho metabolity dostávají do jater, kde jsou vystaveny další konjugaci. Dochází ke vzniku nových sulfátových nebo glukuronidových derivátů. Také může docházet k další methylaci pomocí enzymu katechol-*O*-methyltransferasa (COMT). Bylo prokázáno, že kvercetin může být systematicky absorbován z gastrointestinálního traktu přes lymfu.
4. Po metabolismu v játrech jsou žlučí vylučovány do tenkého střeva jak methylované produkty, tak i produkty sulfatace a glukuronidace. Glukuronidy jsou dekonjugovány a výsledný aglykon je reabsorbován nebo degradován na fenolové kyseliny.



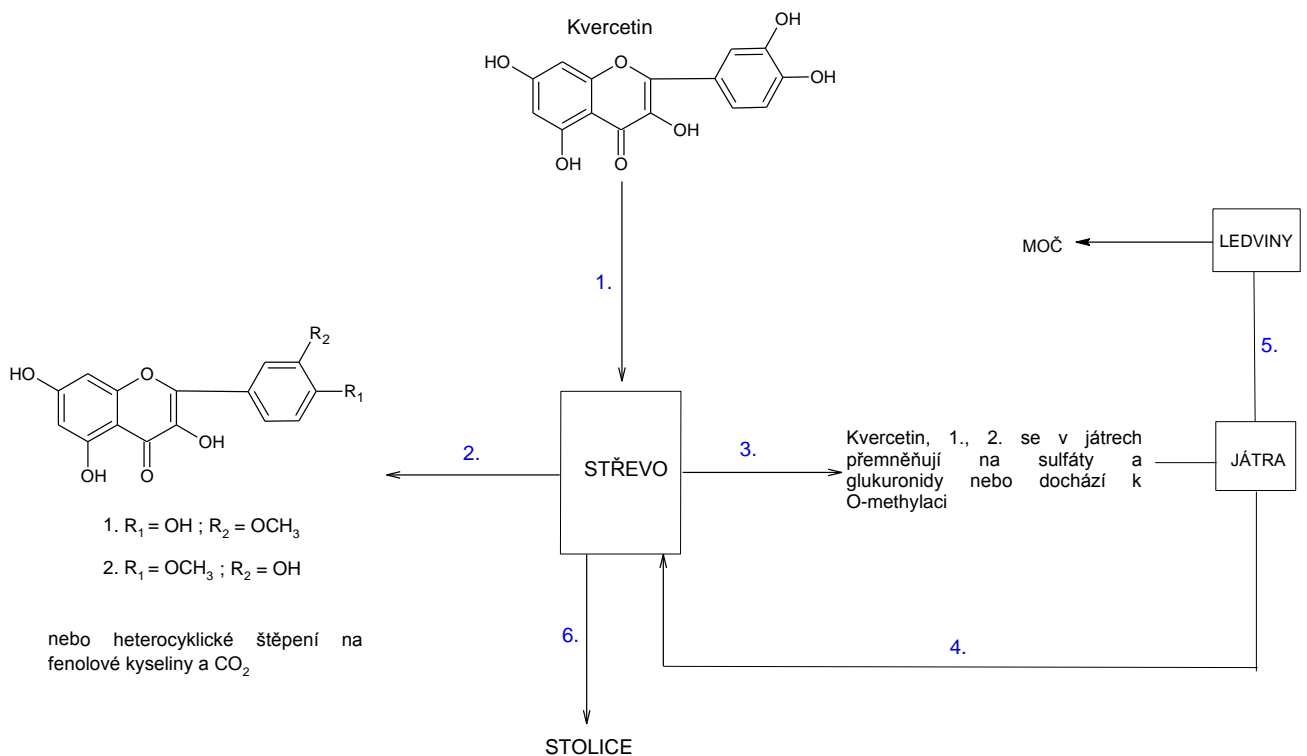
5. Kvercetin a produkty metabolismu mohou být dále převedeny do ledvin.

V ledvinách jsou zpracovány a jako odpadní látky se dostanou do moči, kterou jsou vyloučeny z organismu.

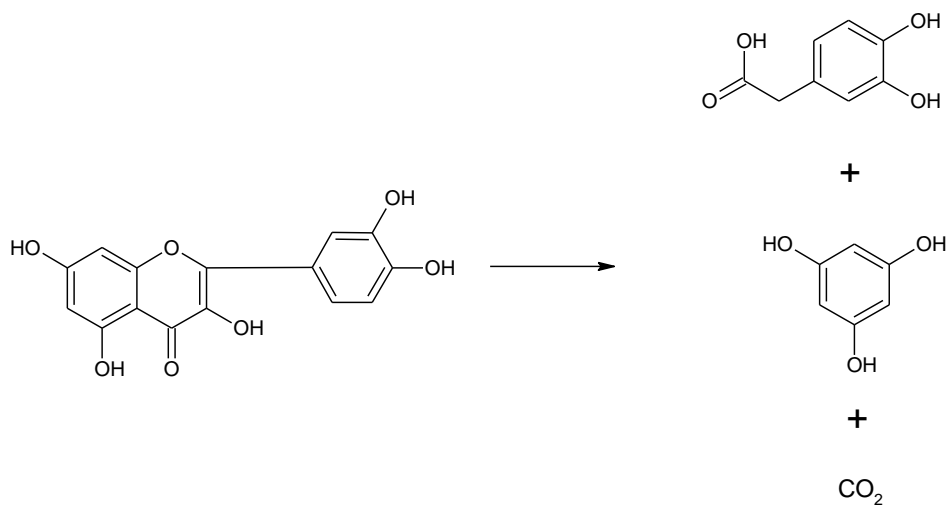
6. Jednotlivé metabolity kvercetinu a popřípadě samotný kvercetin mohou být vyloučeny také ve formě stolice.

Více než 90% orálně podané dávky kvercetinu je metabolizováno ve střevě, zatímco játra se podílejí jen na 3% metabolismu dané dávky.

Rozsáhlá glukuronidace a sulfatace polyfenolů může značně snížit jejich antioxidační aktivitu. <sup>26</sup>



Obr. 5 Metabolismus kvercetinu



Obr. 6 Anaerobní mikrobiální rozklad <sup>5</sup>

### 2.1.6.2 Biologická dostupnost

Dříve, při měření koncentrace volného kvercetinu v plazmě po orálním podání dobrovolníkům, nebyla prokázána jeho přítomnost, za což mohla nedokonalost detekční techniky. Proto se vědci domnívali, že kvercetin se v plazmě vyskytuje jen jako různé konjugované formy. Nejnovější testy využívají zlepšené detekční metody, které mohou prokázat kvantitativní stopu aglykonu v plazmě. <sup>15, 27</sup>

Nepřímým důkazem jejich absorpce v trávicím traktu je zvýšení antioxidační kapacity plazmy po jejich konzumaci. Přímým důkazem je měření koncentrace polyfenolů v plazmě a moči po jejich podání. <sup>15, 25</sup>

Koncentrace flavonolů v plazmě, po příjmu potravy bohaté na rostlinné polyfenoly, je velmi nízká, a tudíž mohou jen málo přispívat k antioxidační kapacitě plazmy. Je to dáno tím, že po konzumaci kvercetinů je 60% dávky metabolizováno, což je výsledek efektu prvního průchodu střevem. To zapříčiňuje extrémně nízkou koncentraci nekonjugovaného kvercetinového aglykonu cirkulujícího v plazmě. K nárustu antioxidační aktivity plazmy přispívají především metabolity vznikající částečnou O-methylací nebo ty, které si zachovávají katecholovou strukturu.<sup>28</sup>

Průměrný denní příjem flavonolů byl stanoven pouze na 20-35 mg. Největší množství konjugovaných forem kvercetinů v plazmě bylo zaznamenáno po příjmu cibule (7,6  $\mu\text{mol/l}$ ). Podáním čistého 4'-glukosidu byla koncentrace kvercetinů v plazmě 7  $\mu\text{mol/l}$ .<sup>27</sup>

## 2.1.7 Toxicita

### 2.1.7.1 Studie *in vitro*

Kvercetin byl důsledně testován pro jeho mutagenní aktivitu u většiny standardních kmenů *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*. Mutagenita pozorovaná u testovaných bakteriálních systému byla potvrzena. Taktéž se projevila u eukaryotních buněk. Lymfocyty křečka, myši a také lidské lymfocyty vykazovaly po vystavení kvercetinu chromozomální aberace, poškození vlákna DNA, fragmentaci jádra.

Methylací kvercetinu na různých hydroxylových skupinách dochází k výraznému oslabení, či úplnému zrušení jeho mutagenního účinku <sup>14</sup>. <sup>2</sup>

### 2.1.7.2 Studie *in vivo*

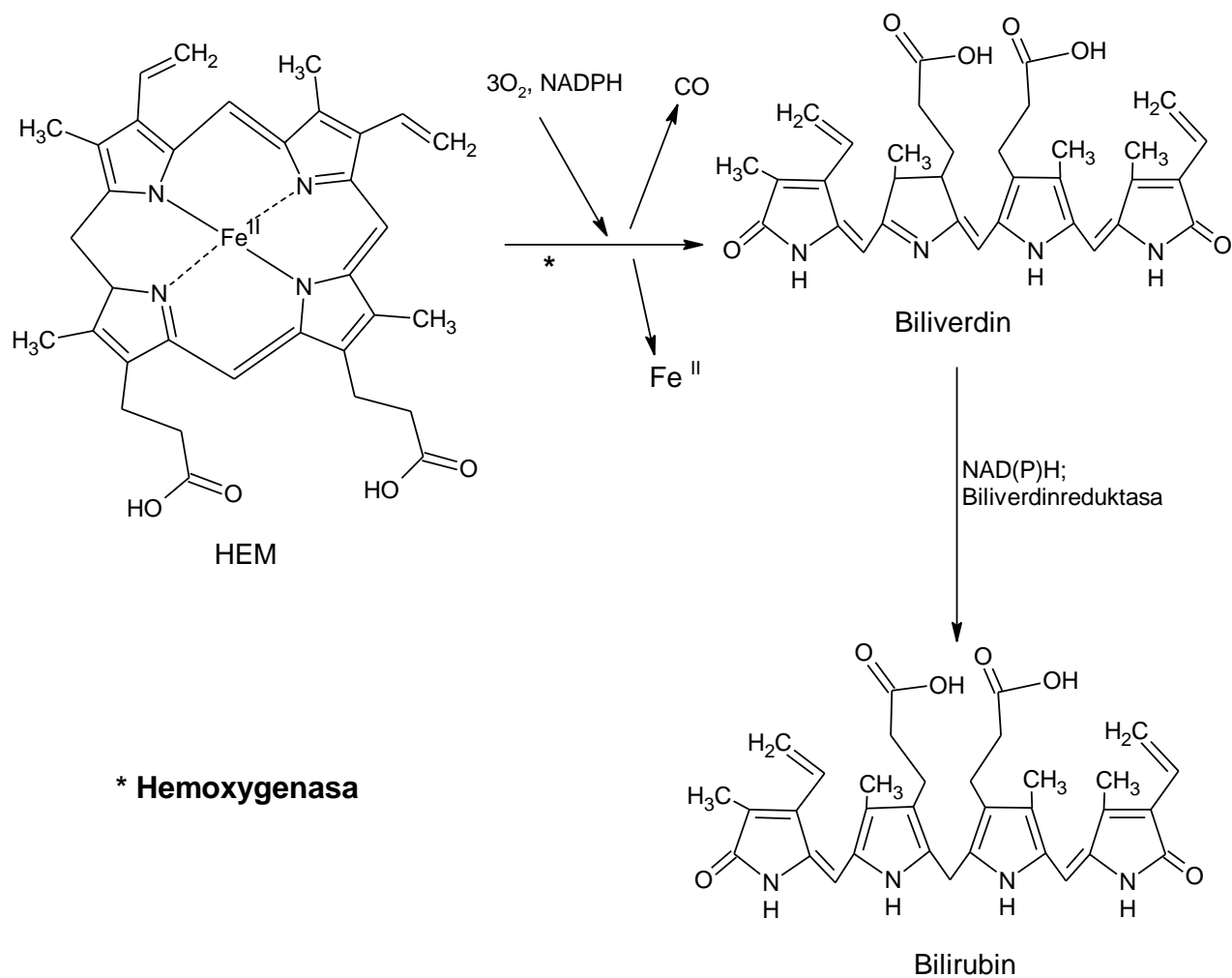
Výsledky, související s mutagenitou a genotoxicitou, pozorované v *in vitro* studiích, nebyly potvrzeny experimenty prováděnými *in vivo*. Po orálním podání kvercetinu myším a potkanům, nebyly vyvolané žádné významné reakce, které by se projevovaly mutagenní aktivitou. U některých testů se sice mutagenita projevila, ale při posouzení všech vlastností kvercetinu, je význam těchto účinků diskutabilní (z hlediska jeho širšího používání). <sup>2</sup>

Většina polyfenolů má katecholovou skupinu, která může být oxidována na chinon *in vivo*, což má za následek produkci volných radikálů. Enzymy

chinonreduktasa a katechol – *O* – methyltransferasa omezují tvorbu chinonů, jež by jinak mohly vyvolávat toxické působení na organismus. <sup>13</sup>

## 2.2 HEMOXYGENASA

Hemoxygenasa je enzym, který katalyzuje rozklad hemu na biliverdin, za současného uvolnění oxidu uhelnatého a železa. <sup>29</sup> Biliverdin je následně biliverdinreduktasou přeměněn na bilirubin <sup>30, 31</sup> (Obr. 7).



Obr. 7 Metabolismus hemu <sup>31</sup>

### System hemoxygenasy obsahuje tři izoenzymy:

1. Induktivní ( inducibilní) formu hemoxygenasa-1,
2. Konstitutivní (konstitutivně exprimovaná) formy hemoxygenasa-2 a hemoxygenasa-3. <sup>32</sup>

Hemoxygenasa-1 se nachází v tkáních, které jsou mimo nervový systém, jako odpověď na stresující podmínky, kdežto hemoxygenasu-2 a hemoxygenasu-3 bychom našli v nervových buňkách. Nedávné studie prokázaly, že hemoxygenasa-1 hraje klíčovou roli v obranném mechanismu proti oxidačnímu poškození. <sup>33</sup>

Při zvýšeném množství reaktivních kyslíkových částic (ROS) v organismu, je poskytnuta buněčná ochrana právě hemoxygenasou-1, jejíž hladina je během těchto podmínek zvýšena. <sup>34</sup>

Jelikož při syntéze hemu mohou být vytvářeny reaktivní kyslíkové částice, je jeho degradace velmi důležitá z důvodu tvorby barviv biliverdinu a bilirubinu, které vykazují antioxidační aktivitu. Volné železo, které je uvolňováno degradací hemu, je velmi toxické a může poškozovat tkáň přeměnou peroxidu vodíků na volné radikály <sup>35</sup>. Železo uvolněné při degradaci může být znovu vázáno na nově vznikající hem, v takovém případě slouží hem jako chelatační činidlo. Tyto dvě cesty pro tvorbu a zánik hemu jsou tedy úzce spojeny. <sup>32</sup>

Tento cytoprotektivní enzym je kontrolován jaderným transkripčním faktorem Nrf2 (nuclear factor erythroid 2 – related factor 2). Nrf2 je důležitým aktivačním faktorem transkripce genů enzymů potlačujících oxidativní stres. Aktivita Nrf2 je negativně regulována represorem Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1).<sup>36, 37</sup>

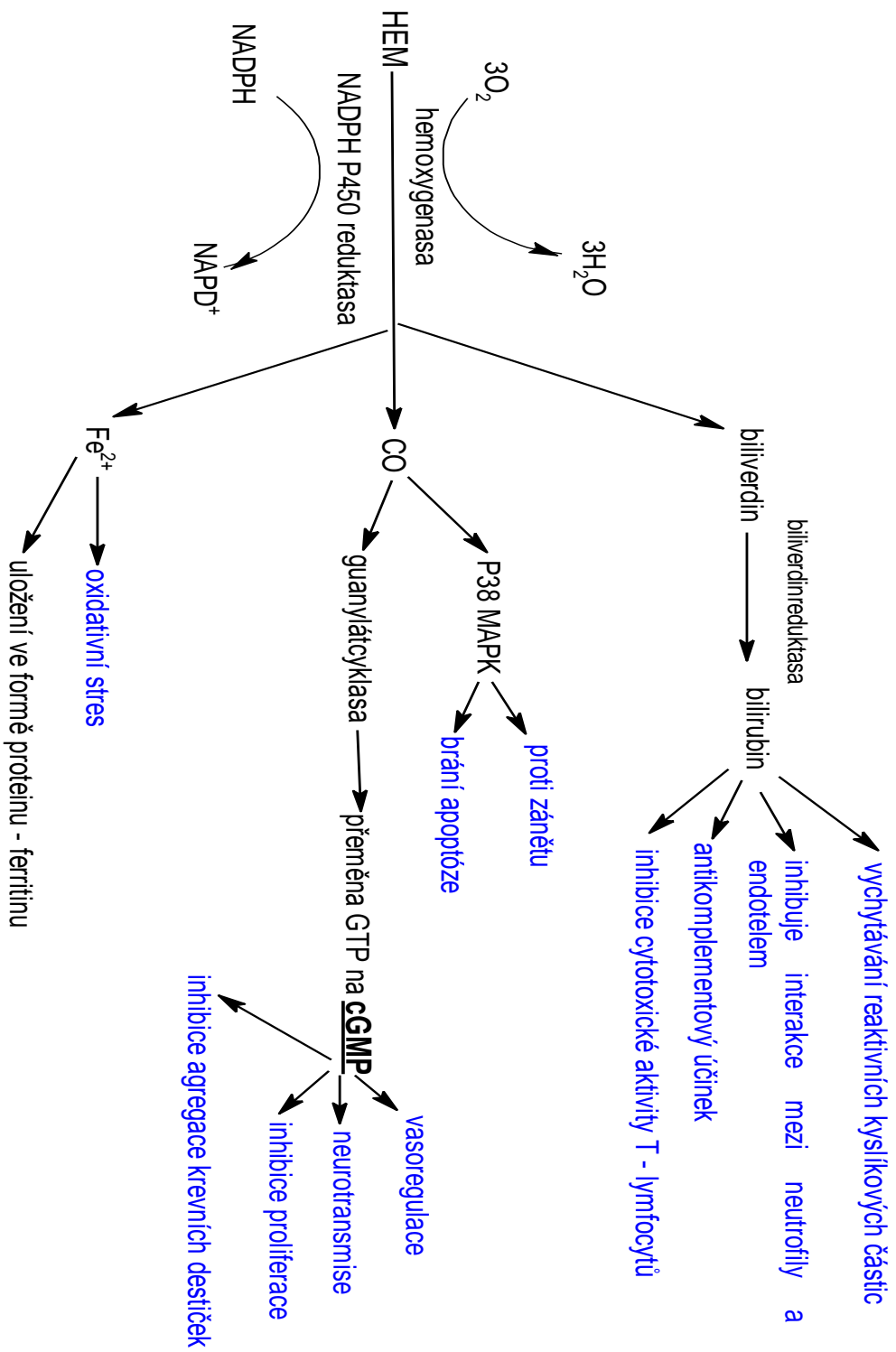
Keap 1 se váže na Nrf2, to zapříčiňuje jeho zadržení v cytoplazmě, kde nastává proteosomální Nrf2 degradace. Na druhou stranu spojení Keap1-Nrf2 vede k regulaci množství Nrf2 v jádře, protože bez jeho kontroly by mohlo docházet k nekontrolovanému přepisu genetické informace.<sup>38</sup>

Gen, který kóduje hemoxygenasu -1 se označuje Hmox1. Jedná se o myší gen. Vliv antioxidantů na expresi Hmox1 je studován v této práci.

Při testování *in vitro* vyplynula skutečnost, že biliverdin a bilirubin vznikající degradací hemu se vykazují antioxidantními vlastnostmi.<sup>32, 39</sup> Rozkladem hemu je také produkován CO, který působí protizánětlivě.<sup>14</sup>

Schéma znázorňující působení hemoxygenasy na hem za vzniku produktů biliverdinu, CO a železnatého iontu je zobrazeno na Obr. 8. U jednotlivých produktů degradace hemu nebo látek, které jsou vyvolány přítomností biliverdinu, CO a železnatých iontů v organismu, je modrou barvou popsán jejich biologický účinek.





Obr. 8 Biologické působení hemoxygenasy<sup>40</sup>

## 2.3. POPIS METOD UŽITÝCH PŘI TESTOVÁNÍ FLAVONOIDOVÝCH LÁTEK

### 2.3.1 Spektrofotometrické měření absorbance

Absorbance  $A$  pro uvedené toky monochromatického záření je veličina, která je charakterizována množstvím vstupujícího záření podle množství prošlého záření vzorkem. <sup>41</sup>

Chemické metody, pro měření antioxidační aktivity a využívající měření absorbance, spočívají v použití činidel poskytujících s volnými radikály barevné produkty, jejichž vzniku brání ve vzorku obsažené antioxidanty. Volné radikály mohou být buď syntetické (například DPPH) nebo reaktivní kyslíkové formy (ROS). <sup>42</sup>

Intenzita zabarvení se nejčastěji měří spektrofotometricky a rozdíl v hodnotách absorbancí měřeného a slepého vzorku udává množství látek obsažených ve vzorku s antioxidačními účinky. <sup>43</sup>

Výpočet pro schopnost daného antioxidantu inhibovat radikál:

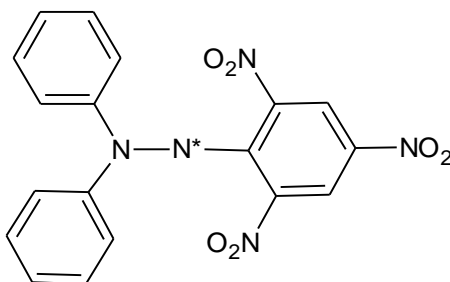
$$\text{Inhibice [\%]} = \frac{A_{\text{blank}} - A_{\text{vzorek}}}{A_{\text{blank}}} \times 100$$

### 2.3.2 Difenylpikrylhydrazyl (DPPH)

Organická sloučenina, mající v roztoku fialovou barvu. Díky své struktuře může být akceptorem atomu vodíku a přejít do formy stabilní molekuly.

Když je DPPH neutralizováno, jeho barva se mění na světle žlutou až bezbarvou. Tato barevná přeměna může být použita jako vizuální indikátor neutralizace DPPH.

Její absorpční pás dosahuje svého maxima při 517nm, proto měření poklesu absorbance probíhá právě při této vlnové délce.



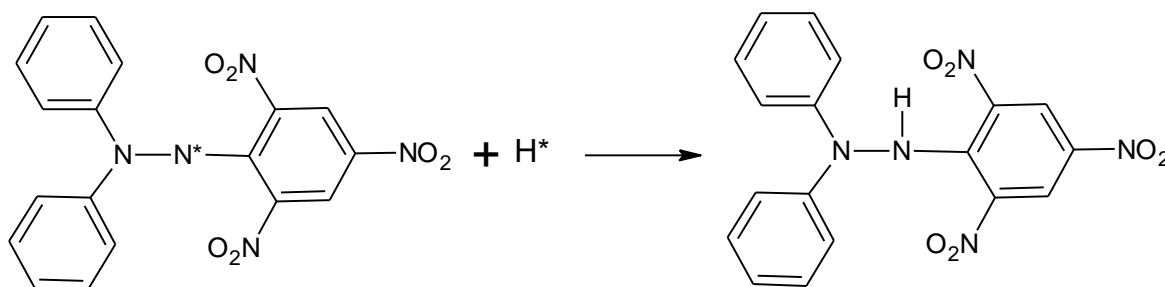
Obr. 9 Strukturální vzorec DPPH (1,1-difeny-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl)

#### 2.3.2.1 DPPH metoda

Metoda založená na eliminaci radikálu. Díky ní můžeme pozorovat schopnost jednotlivých antioxidantů vylučovat difenylpikrylhydrazylový radikál. Radikály mohou vznikat přímo v reakční směsi (kyslíkové radikály), anebo mohou být do směsi přidány (DPPH) <sup>42</sup>.

Je jedním ze základních postupů při posouzení antiradikálové aktivity čistých i směsných látek. <sup>21</sup>

DPPH (1,1-difeny-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl) se reakcí s antioxidantem redukuje a vzniká DPPH-H (difenylpikrylhydrazin) <sup>19</sup>. (znázorněno na Obr. 10).



Obr. 10 Schéma reakce s radikálem DPPH

Vodík na obrázku byl poskytnut antioxidantem, který vytvoří radikál, ten je při terminační reakci přeměněn na neradikálovou sloučeninu, jež nejčastěji vzniká interakcí dvou radikálových látek mezi sebou.

### 2.3.3 Real - time PCR (RT PCR)

Detekční postup využívající polymerázové řetězové reakce (PCR). Slouží k sekvencování genomů velké škály různých organismů <sup>44</sup>. V průběhu reakce je přímo kvantifikován PCR produkt, odtud název Real-time PCR (=polymerázová řetězová reakce v reálném čase) <sup>45</sup>.

Kvantifikace molekul nukleových kyselin je důležitá při podrobném studiu genové exprese nebo diagnostice některých patogenů. Tato technika dovoluje analýzu z velmi malých množství vzorku. <sup>46, 47</sup>

V několika studii byla popsána více než 90% úspěšnost při použití této metody detekce <sup>48</sup>.

### **2.3.3.1 Princip RT PCR**

RT PCR se od klasické PCR liší kontinuálním monitorováním přírůstku produktu PCR, během každého cyklu (klasická PCR detekuje až finální produkt). Základní podmínkou je přítomnost fluorescenčního substrátu, který se váže na syntetizovanou DNA. Změna intenzity detekované fluorescence je měřítkem množství vznikajícího produktu. <sup>49</sup>

### **2.3.3.2 Reverzní transkripce a RT PCR**

Enzymatická reakce katalyzovaná reverzní transkriptasou. Jedná se o přepis genetické informace podle templátu RNA na DNA. Takto získaná DNA je označována jako cDNA (= complementary DNA). <sup>47</sup> Vzniká však hybrid RNA-DNA, který není vhodný k další práci. Použití reverzní transkripce je tedy často pojeno s RT PCR, protože dále touto metodou může být DNA kvantifikována. <sup>50</sup>

### 2.3.3.3 SONDY RT PCR

Jedná se o fluorescenční látky. Jejich dělení je dáno kritériem na požadovaný produkt PCR:

1. nespecifické – vážou se nespecificky na dvouvláknovou DNA
2. specifické – ve své struktuře mají oligonukleotidový řetězec, kterým se hybridizují k PCR amplikonu. <sup>45, 47, 49</sup>

Mezi specifické patří sonda, která byla použita při provádění měření v této práci. Jedná se o hydrolyzační <sup>47</sup> sondu TaqMan.

#### Sonda TaqMan

Sekvenčně specifická fluorogenní sonda <sup>47</sup>. Sonda obsahuje oligonukleotid s fluorescenční značkou a zhasěčem, který se váže na vnitřní část amplifikované sekvence <sup>48</sup>. Pokud primer vytváří homoduplex, je rozložen 5'-exonukleasovou aktivitou DNA-polymerasy. Po připojení primeru ke komplementárnímu úseku je emitována fluorescence. <sup>46</sup> Jedná se o hybridizační metodu využívanou např. pro detekci bodových mutací <sup>48</sup>.

### **3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

## 3.1 METODY

### 3.1.1 Chemikálie

Kvercetin byl pořízen od firmy Merck (Darmstadt, Německo). Isokvercitrin a taxifolin byly dodány Mikrobiologickým ústavem AVČR (Praha, Česká republika). Rutin byl získán od Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, USA). DPPH pořízeno také od Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, USA). Firma Merck (Darmstadt, Německo) poskytla methanol. Myší makrofágové linie RAW264.7 dodala evropská banka buněčných kultur (No. 91062702, ECACC, Salisbury, UK). Fetální hovězí sérum dodala firma Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Dulbeccem modifikované Eaglovo médium zakoupené od Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, USA). Činidlo TRI Reagent, Sada primerů pro reverzní transkripci, barvivo FAM a amplifikační média TaqMan Universal PCR Master Mix a Taq-Man Gene Expression Assay od Applied Biosystems (Foster City, CA, USA).

### 3.1.2 Zhášení difenylpikrylhydrazylvého radikálu

Methanolický roztok difenylpikrylhydrazylvého radikálu (DPPH) byl připraven smícháním 1g krystalického DPPH a methanolu, který byl doplněn na množství 50 ml odměrné baňky. Pro každé měření byly chystány nové methanolické roztoky testovaných látek (kvercetinu, isokvercitrinu, rutinu, taxifolinu), které byly dále ředěny podle požadované koncentrace. Pro stanovení aktivity byla využita 96 - jamková



mikrodestička. Nejprve se do jamek pipetovalo 90 µl methanolického roztoku testované látky o dané koncentraci a poté osmikanálovou pipetou bylo aplikováno do všech jamek 180 µl methanolického roztoku DPPH. Do srovnávacích jamek bylo pipetováno 90 µl metanolu a také 180 µl roztoku DPPH. Následovala 30 minutová inkubace za pokojové teploty, po jejímž uplynutí se absorbance směsi měřila při 517 nm.

Zjištění inhibice jednotlivých látek probíhalo pomocí naměřených absorbancí podle vzorce:

$$\text{Inhibice [\%]} = \frac{A_{\text{blank}} - A_{\text{vzorek}}}{A_{\text{blank}}} \times 100$$

Měření absorbance bylo provedeno na přístroji Tecan infinite M200 - microplate reader (Tecan GmbH, Rakousko).

### 3.1.3 Kultivace buněk RAW264.7 a jejich ošetření

Myší makrofágy buněčné linie RAW264.7 byly kultivovány při 37 °C v Dulbeccem modifikovaném Eaglovu médiu doplněném 2 mM L- glutaminem, 100 U/ml penicilinu, 100 µg/ml streptomycinu a 10% plodového hovězího séra. Takto ošetřené buněčné linie byly uchovávány ve vlhké atmosféře obsahující 5% CO<sub>2</sub>. Buňky byly pěstovány v baňkách o obsahu 75 cm<sup>2</sup> a byly pravidelně pasážovány. Pro všechny experimenty byly buňky RAW264.7 (5 až 25 pasáže) nasazeny v celém kultivačním médiu při

hustotě  $1 \times 10^5$  buněk/cm<sup>2</sup>. Po 8 hodinové stabilizaci, kultivační médium bylo vyměněno za médium bez séra. Dále proběhla inkubace přes noc. Poté následovalo ošetření buněk testovanými látkami po dobu 6 hodin, které se provádělo v médiu neobsahujícím sérum. Kontrolní buňky byly ošetřeny pouze 0,1 % (v/v) DMSO (dimethylsulfoxidu).

### 3.1.4 Reverzní transkripce a kvantitativní RT PCR

Po ošetření byla všechna RNA extrahována pomocí činidla TRI Reagent. Koncentrace RNA stanovena spektrofotometricky při 260 nm. Vzorky RNA (2 µg) byly reverzní transkripcí přepsány na cDNA pomocí sady primerů pro reverzní transkripci podle doporučení výrobce. RT PCR byla provedena systémem LightCycler 480 II (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) za využití TaqMan Universal PCR Master Mix a Taq-Man Gene Expression Assay skládající se z charakteristických primerů. Barvivem FAM byl značený malý žlábek TaqMan sond. Test ID pro Hmox 1 byl Mm00516005\_m1 a pro Gapdh Mm99999915\_g1. Reprodukovatelnost testu byla zajištěna měřením při 50° C po dobu 2 min, 95° C po dobu 10 min, následovalo 40 cyklů při 95° C po dobu 15 s a 60 cyklů po dobu 1 min. Přechodové hodnoty, odpovídají C<sub>T</sub>, byly stanoveny automatickým použitím druhé derivace maximální analýzy. Relativní změny v genové expresi byly vypočteny srovnáním C<sub>T</sub> metody užitím rovnice  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  s výsledky normalizovanými na Gapdh mRNA urovních.

## 3.2 VÝSLEDKY

### 3.2.1 Zhášení radikálu difenylpicrylhydrazylu (DPPH) studovanými flavonoidy

Zhášení radikálu DPPH je metoda, při níž se hodnotila účinnost jednotlivých měřených látek vychytávat difenylpicrylhydrazylový radikál. U kvercetinu byla tato schopnost prokázána ve větší míře již při nižších koncentracích, proto jsem se jeho antioxidační aktivitu rozhodla stanovovat u menších koncentrací. Vlastnosti neutralizovat radikál difenylpicrylhydrazil se u nižších koncentrací projevily jen při množství 0,5  $\mu\text{mol/l}$  kvercetinu ve stanovovaném roztoku.

Měření probíhalo ve třech sadách po třech měřeních, tedy proběhlo dohromady devět měření, které byly zprůměrovány.

Stanovení antioxidační aktivity bylo možné určit po inkubaci vzorků již vizuálně. U jamek o různé koncentraci kvercetinu byl největší barevný posun, který odpovídal přechodu původního fialového roztoku do světle žlutého zbarvení. Rutin a isokvercitrin si byly zbarvením vzorků velmi podobné. Taxifolin měl nejmenší posun odpovídající přechodu fialové barvy do barvy žluté.

Srovnáním výsledků dosažených při koncentraci 5  $\mu\text{mol/l}$  je patrné, že kvercetin, isokvercitrin a rutin měly přibližně stejnou schopnost zhášet radikál DPPH. Při koncentraci flavonoidů 5  $\mu\text{mol/l}$ , u kvercetinu zreagovalo 54,66 % DPPH, u rutinu 52,36% DPPH a u isokvercitrinu 59,06% DPPH. O něco nižší schopnost zhášet radikál DPPH měl taxifolin, při koncentraci 5  $\mu\text{mol/l}$  zreagovalo pouze 32,72% DPPH.

V tabulkách 1- 4 jsou zaneseny výsledky měření kvercetinu a jeho derivátů odpovídající testování látek metodou DPPH.

KVERCETIN	koncentrace [μmol/l]	inhibice [%] průměr	směrodatná odchylka
	0	0	
	0,1	0	
	0,2	0	
	0,5	6,71	6,951
	1	12,97	2,11
	2	18,47	2,207
	5	54,66	1,868
	10	81,2	0,491

*Tab. 1 Výsledky měření kvercetinu*

RUTIN	koncentrace [μmol/l]	inhibice [%] průměr	směrodatná odchylka
	0	0	
	1	9,09	3,716
	2	24,56	10,672
	5	52,36	4,504
	10	80,17	0,575
	20	80,75	0,409
	50	80,73	0,136
	100	81,05	0,452

*Tab. 2 Výsledky měření rutinu*

ISOKVERCITRIN	koncentrace [ $\mu\text{mol/l}$ ]	inhibice [%] průměr	směrodatná odchylka
	0	0	
	1	8,48	3,935
	2	24,96	8,803
	5	59,06	6,911
	10	79,81	0,385
	20	81,07	2,017
	50	80,28	1,489
	100	82,05	0,4

*Tab. 3 Výsledky měření isokvercitrinu*

TAXIFOLIN	koncentrace [ $\mu\text{mol/l}$ ]	inhibice [%] průměr	směrodatná odchylka
	0	0	
	1	10,62	3,828
	2	19,82	4,472
	5	32,72	6,043
	10	68,59	2,71
	20	82,2	0,539
	50	82,14	0,485
	100	81,98	0,956

*Tab. 4 Výsledky měření taxifolinu*

### 3.2.2 Měření vlivu kvercetinu a jeho derivátů na expresi genu Hmox1

Gen Hmox1 kóduje antioxidační a cytoprotektivní enzym hemoxygenasa- 1.

Vliv látek na expresi genu Hmox1 byl studován pomocí kvantitativní PCR analýzy. Po inkubaci myších makrofágových buněk RAW264.7 s testovanými látkami po dobu 6 hodin bylo zjištěno, že kvercetin zvyšuje expresi genu Hmox1. Při koncentraci 50

$\mu\text{mol/l}$  kvercetin zvýšil expresi genu Hmox1 4,3krát ve srovnání s kontrolou. Naproti tomu glykosidy kvercetinu a taxifolin měly bezvýznamný vliv na expresi genu Hmox1.

Výsledky jsou průměrem ze tří měření. (Tabulka 5)

koncentrace [ $\mu\text{mol/l}$ ]	hladina Hmox1 mRNA	
	[násobky indukce]	směrodatná odchylka
kontrola	1,00	0,00
kvercetin 10	1,13	0,01
kvercetin 50	4,33	0,57
taxifolin 10	0,97	0,08
taxifolin 50	0,95	0,02
rutin 10	0,99	0,05
rutin 50	1,06	0,11
isokvercitrin 10	0,92	0,09
isokvercitrin 50	0,89	0,13

Tab. 5 Výsledky měření stanovených látek na tvorbu hemoxygenasy- 1

#### 4. ZÁVĚR A DISKUZE

Tato práce se zabývala antioxidační aktivitou přírodního flavonolu kvercetin a jeho derivátů – taxifolinu (dihydrokvercetin) a dvou kvercetinových glykosidů, rutin (kvercetin -3- rutinosid) a isokvercitrin (kvercetin -3- glukosid), což jsou látky běžně přítomné v některých potravinách rostlinného původu. <sup>2</sup>

Metoda založená na sledování vychytávání radikálu DPPH ukázala, že kvercetin, isokvercitrin a rutin mají srovnatelnou antiradikálovou aktivitu, zatímco aktivita taxifolinu byla alespoň při určitých koncentracích nižší. Důvodem může být absence dvojné vazby mezi uhlíkem 2 a 3 heterocyklického kruhu. Jednoduchá vazba je velmi málo reaktivní a může být příčinou jeho nižší antiradikálové schopnosti. <sup>51</sup>

Je nutné zmínit, že metoda založená na vychytávání radikálu DPPH se provádí v metanolu, což je zcela jiné prostředí než vodné prostředí buňky.

Antioxidační vlastnosti studovaných látek mohou souviset nejen s chemickým vychytáváním radikálů, ale i s ovlivněním exprese antioxidačních enzymů.

V této práci byl studován vliv flavonoidů na expresi genu Hmox1, který kóduje cytoprotektivní a antioxidační enzym hemoxygenasu- 1. Hemoxygenasa- 1 je indukibilní forma hemoxygenasy, která je zodpovědná za degradaci hemu a produkci antioxidantu biliverdinu a protizánětlivého mediátoru CO. <sup>14</sup>

Výsledky ukázaly, že ze studovaných látek pouze kvercetin zvyšuje expresi genu Hmox1. Tato schopnost kvercetinu souvisí s jeho schopností aktivovat transkripční faktor Nrf2, který reguluje expresi hemoxygenasy- 1 a dalších cytoprotektivních enzymů. <sup>33</sup>

Glykosidy kvercetinu expresi genu Hmox1 neovlivnily, což je v souladu s dříve publikovanými výsledky. <sup>33</sup>

Lze tedy říci, že kvercetinový aglykon může v buňce vykazovat vyšší antioxidační účinky než jeho glykosylované formy. Kdyby isokvercitrin a rutin byly v organismu deglykosylovány, mohly by také ovlivnit tvorbu hemoxygenasy- 1. Stejně tak deglykosylace isokvercitrinu a rutinu by mohla ovlivnit vychytávání DPPH a jiných radikálů, a to z toho důvodu, že cukerné složky díky své polaritě mohou zabraňovat vstupu kvercetinových glykosidů do buňky.

Expese genu Hmox1 nebyla ovlivněna ani taxifolonom, jehož nižší biologická aktivita může vyplývat z jeho hydrofilnějšího charakteru a menšího vstupu do buňky v porovnání s kvercetinem. <sup>52</sup>

Z uvedených výsledků vyplývá, že studované látky mají antiradikálovou aktivitu, přičemž kvercetin jako jediný může zvýšit kapacitu enzymového antioxidačního systému buňky.



## 5. LITERATURA

1. Verhoeven, M.E., Bovy, A., Collins, G., Muir, S., Robinson, S., de Vos, C.H.R., Colliver, S.: Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the flavonoid biosynthetic pathway, *Journal of Experimental Botany* **2002**, 53, 2099- 2101.
2. Harwood, M., Danielewska-Nikiel, B., Borzelleca, J.F., Flamm, G.W., Williams, G.M., Lines, T.C.: A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties, *Food Chemical Toxicology* **2007**, 45, 2179-2186.
3. Winterbone, M.S., Tribolo, S., Needs, P.W., Kroon, P.A., Hughes, D.A.: Physiologically relevant metabolites of quercetin have no effect on adhesion molecule or chemokine expression in human vascular smooth muscle cells, *Arteriosclerosis* **2009**, 202;431-438.
4. Morand, CH., Crespy, V., Manach, C., Besson, C., Demigné, CH., Rémésy, CH.: Plasma metabolite of quercetin and their antioxidant properties, *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **1998**, 275;212-219.
5. Tranchimand, S., Brouant, P., Iacazio, G.: The rutin catabolic pathway with special emphasis on quercetinase, *Springer Science+Business Media B.V.* **2010**, DOI 10.1007/s10532-010-9359-7.

6. Sakihama, Y., Cohen, M. F., Grace, S. C., Yamasaki, H.: Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics – induced oxidative damage mediated by metals in plants, *Toxicology* **2002**, 177; 67- 74.
7. Manach, C., Scalbert, A., Morand, Ch., Rémésy, Ch., Jiménez, L.: Polyphenols: food sources and bioavailability, *The American Journal of Clinical Nutrition* **2004**, 79; 727- 741.
8. Tribolo, S., Lodi, F., Connor, C., Siri, S., Wilson, V.G., Taylor, M.A., Needs, P.W., Kroon, P.A., Hughes, D.A.: Comparative effects of quercetin and its predominant human metabolites on adhesion molecule expression in activated human vascular endothelial cells, *Atherosclerosis* **2008**, 197;50-56.
9. Schijen, E.G.W.M., Ric de Vos, C.H., van Tunen, A.J., Bovy, A.G.: Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants, *Phytochemistry* **2004**, 65; 2631-2648.
10. Gitz, D.C., Lan Liu – Gitz, McClure, J.W., Huerta, A.J.: Effects of a PAL inhibitor on phenolic accumulation and UV-B tolerance in *Spirodela intermedia*, *Journal of Experimental Botany* **2004**, 55, 919- 927.
11. Carey, CH.C., Strahle, J.T., Selinger, D.A., Chandler, V.L.: Mutation in the pale *aleurone color1* regulatory gene of the *Zea mays* anthocyanin pathway have distinct phenotypes relative to the functionally similar *transparent testa glabra1* gene in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell* **2004**, 16, 450 – 464.

12. Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A.A., Capasso, F.: Flavonoids: Old and New Aspects of a Class of Natural Therapeutic Drugs, *Life Sciences* **1999**, 65 (4), 338-347.
13. Scalbert, A., Manach, C., Morand, Ch., Rémésy, Ch., Jimenéz, L.: Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2005**, 45; 278 – 296.
14. Cao, G., Sofic, E., Prior, R. L.: Antioxidant and prooxidant behavior flavonoids: Structure-activity relationships, *Free Radical Biology and Medicine* **1997**, 22; 749 – 758.
15. Trna, J., Táborská, E.: Přírodní polyfenolové antioxidanty. Internetový zdroj: [www.med.muni.cz/biochem/seminare/priantiox.rtf](http://www.med.muni.cz/biochem/seminare/priantiox.rtf), přečteno dne 22.11. 2011
16. Chen, Y., Deuster, P.: Comparison of quercetin and dihydroquercetin: Antioxidant – independent actions on erythrocyte and platelet membrane, *Chemico – Biological Interactions* **2009**, 182; 7 – 9.
17. Rybková, Z., Malachová, K.: Využití plasmidu pBluescript pro detekci antioxidantní aktivity rostlinných fenolových látek, *Chemické Listy* **2011**, 105;129-130.
18. Tirzitis, G., Bartosz, G.: Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights, *Acta Biochimica Polonica* **2010**, 57, 139-140.
19. Paulová, H., Bochořáková, H., Táborská, E.: Metody stanovení antioxidantní aktivity přírodních látek *in vitro*, *Chemické Listy* **2004**, 98; 174-177.

20. Réblová, Z.: Vliv vnějších faktorů na aktivitu antioxidantů, *Chemické Listy* **2011**, 105, 667-669.
21. Seyoum, A., Asres, K., El-Fiky, F.K.: Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids, *Phytochemistry* **2006**, 67, 2058- 2061.
22. Rahman, A., Fazal, F., Greensill, J., Ainley, K., Parish, J. H., Hadi, S.M.: Strand scission in DNA induced by dietary flavonoids: role of Cu(I) and oxygen free radicals and biological consequence of scission, *Molecular and Cellular Biochemistry* **1992**, 111(1-2), 3-9.
23. Williamson, G., Manach, C.: Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humus. II. Review of 93 intervention studies, *The American Journal of Clinical Nutrition* **2005**, 81; 243S – 249S.
24. Kroon, P. A., Clifford, M. N., Crozier, A., Donovan, J. L., Manach, C., Williamson, G.: How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro?, *The American Journal of Clinical Nutrition* **2004**, 80; 15 – 19.
25. Scalbert, A., Williamson, G.: Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols, *The Journal of Nutrition* **2000**, 2073S – 2082S.
26. Manach, C., Mazur, A., Scalbert, A.: Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases, *Current Opinion in Lipidology* **2005**, 16; 1 – 6.
27. Manach, C., Williamson, G., Morand, Ch., Scalbert, A., Rémésy, Ch.: Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97

- bioavailability studies, *The American Journal of Clinical Nutrition* **2005**, 231S-232S.
28. Slanina, J., Táborská, E.: Příklad, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka, *Chemické Listy* **2004**, 98, str. 244.
29. Otterbein, L. E., Soares, M. P., Yamashita, K., Bach, F. H.: Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme, *TRENDS in Immunology* **2003**, 24; 449 – 453.
30. Němčáková, H., Hnízdová, I., Luhová, L., Petřivalský, M.: Nitrované mastné Kyseliny – Nová skupina signálních molekul, *Chemické Listy* **2010**, 104, 759-760.
31. Ryter, W.S., Alam, J., Choi, A.M.K.: Heme Oxygenase-1/Carbon Monoxide: From Basic Science to Therapeutic Applications, *Physiological Reviews* **2006**, 86, 584-587.
32. Ryter, W.S., Tyrrell, M.R.: The heme synthesis and degradation pathways: Role in oxidant sensitivity, *Free Radical Biology and Medicine* **2000**, 28(2), 289-290.
33. Chow, J.-M., Shen, S.-Ch., Huan, S.K., Lin, H.-Y., Chen, Y.-Ch.: Quercetin, but not rutin and quercitrin, preventiv of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis via anti-oxidant activity and heme oxygenase 1 gene expression in macrophages, *Biochemical Pharmacology* **2005**, 69, 1839-1840.
34. Ishii, T., Itoh, K., Takahashi, S., Yanagawa, T., Katoh, Y., Bannai, S., Yamamoto, M.: Transcription Factor Nrf2 Coordinately Regulates a Group of

- Oxidative Stress – inducible Genes in Macrophages, *The Journal of Biological Chemistry* **2000**, 21; 16023 – 16028.
35. Šimek, M.: Nové poznatky o metabolismu železa, *Vnitřní Lékařství* **2005**, 51(3); 345-352.
36. McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M., Hayes, J. D.: Keap1- dependent Proteosomal Degradation of Transcription Factor Nrf2 Contributes to the Negative Regulation of Antioxidant Response Element – driven Gene Expression, *The Journal of Biological Chemistry* **2003**, 24; 21592 – 21593.
37. Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., et al.: Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino – terminal Neh2, *Cold Spring Harbor Laboratory Press* **1999**, 19; 76 – 83.
38. Vrba, J., Orolinova, E., Ulrichova, J.: Induction of heme oxygenase-1 by *Macleaya cordata* extract and its konstituent sanguinarine in RAW264.7 cells, *Fitoterapia* **2012**, 83;329-334.
39. Stocker, R.: Induction of haem oxygenase as a defense against oxidative stress, *Free Radical Research Communications* **1990**, 9;101-112.
40. Naito, Y., Takagi, T., Yoshikawa, T.: Heme oxygenase- 1: a new therapeutic target for inflammatory bowel disease, *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* **2004**, 20; 177 – 182.
41. Němcová, I., Čermáková, L., Rychlovský, P.: Spektrometrické analytické metody I., *Vydavatelství Karolinum Praha* **1997**, 1. vydání , 387-81-97 17/99.

42. Fidler, M., Kolářová, L.: Analýza antioxidantů v chmelu a pivu, *Chemické Listy* **2009**, 103;232-235.
43. Karabín, M., Dostálek, P., Hofta, P.: Přehled metod pro stanovení antioxidační aktivity v pivovarství, *Chemické Listy* **2006**, 100;184.
44. Hochel, I.: Metody detekce a charakterizace *Campylobacter* sp., *Chemické Listy* **2009**, 103; 817-820.
45. Bustin, S. A.: Quantification of mRNA using real – time reverse transcription PCR ( RT – PCR): trends and problems, *Journal of Molecular Endocrinology* **2002**, 29; 23 – 28.
46. Lysková, L., vedoucí práce: Valášková, I.: Real-Time PCR a jeho využití v klinické molekulární diagnostice, Masarykova univerzita Brno, Lékařská fakulta, Bakalářská práce **2008**.
47. Freeman, W. M., Walker, S. J., Vrana, K. E.: Quantitative RT – PCR: Pitfalls and Potential, *The International Journal of Life Science Method* **1999**, 26; 112 – 122.
48. Blažková, M., Fukal, L., Rauch, P.: Nebezpečný patogen *Enterobacter sakazakii* a jeho detekce, *Chemické Listy* **2010**, 104; 113-118.
49. Mičuda, S., Fuksa, L., Btčáková, E., Geršl, V.: Molekulárně biologické metodiky ve farmakologii, Internetový zdroj:  
<http://www.lfhk.cuni.cz/farmakol/interakce/micuda/1.htm>, přečteno 22.11.2011.

50. Alberts, Bray, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter: Základy buněčné biologie – Úvod do molekulární biologie buňky, *Espero Publishing Ústí nad Labem* **1998**, 2. vydání, ISBN 80-902906-2-0, str. 212-273, str. 331-335.
51. Bravo, L.: Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance, *Nutrition Reviews*, Vol. **56**, **1998**, 11; 317 – 333.
52. Moridani, M. Y., Galati, G., O'Brien, P.: Comparative quantitative structure toxicity relationships for flavonoids evaluated in isolated rat hepatocytes and HeLa tumor cells, *Chemico-Biological Interactions* **2002**, 139; 251 – 264.