

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Antiradikálová aktivita kvercetinu a jeho
glykosidů v biologickém systému**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Denisa Gerhardová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Jiří Vrba, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	7. 5. 2012

„Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne

.....
Denisa Gerhardová

„Ráda bych tímto poděkovala svému školiteli Mgr. Jiřímu Vrbovi, PhD. za odborné vedení, cenné rady a čas, který mi věnoval. Především bych chtěla poděkovat i za ochotu a obětavost.

Poděkování věnuji i své rodině a příteli za trpělivost a podporu po celou dobu mého studia.“

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Denisa Gerhardová
Název práce	Antiradikálová aktivita kvercetinu a jeho glykosidů v biologickém systému
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Ústav lékařské chemie a biochemie, LF UP Olomouc
Vedoucí práce	Mgr. Jiří Vrba, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2012
Abstrakt	<p>Tato práce se zabývá srovnáním antiradikálové aktivity čtyř flavonoidů, kvercetinu, taxifolinu (dihydrokvercetin), rutinu (kvercetin-3-O-rutinosid) a isokvercitrinu (kvercetin-3-O-glukosid). Byla porovnávána schopnost vychytávat superoxidový radikál produkovaný v diferencovaných buňkách HL-60 fagocytovou NADPH-oxidase aktivovanou forbolovým esterem. Buňky HL-60 diferencují vlivem dimethylsulfoxidu na buňky podobné neutrofilům, což je doprovázeno expresí NADPH-oxidasy. Její funkčnost byla ověřena chemiluminiscenční metodou. Antiradikálová aktivita testovaných látek byla hodnocena jako schopnost potlačit redukci cytochromu c superoxidovým radikálem. Bylo zjištěno, že tato schopnost je ovlivněna jak koncentrací, tak fyzikálně-chemickými vlastnostmi flavonoidů. Při nižší testované koncentraci byl nejúčinnějším vychytávačem superoxidového radikálu taxifolin, méně účinné byly glykosidy rutin a isokvercitrin a nejméně účinný byl kvercetin. Při vyšší koncentraci byl naopak nejúčinnější kvercetin. Případná cytotoxicita látek vůči diferencovaným buňkám HL-60 byla vyloučena na základě analýzy buněčného cyklu (sub-G1 DNA) a mitochondriálního membránového potenciálu průtokovou cytometrií. Z provedené studie vyplývá, že testované flavonoidy mohou při netoxických koncentracích vychytávat superoxidový radikál produkovaný aktivovanými neutrofilly.</p>

Klíčová slova	kvercetin, glykosidy, taxifolin, antiradikálová aktivita, oxidativní vzplanutí, toxicita
Počet stran	49
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Denisa Gerhardová
Title	Antiradical activity of quercetin and its glycosides in biological system
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of medical chemistry and biochemistry, LF UP Olomouc
Supervisor	Mgr. Jiří Vrba, Ph.D.
The year of presentation	2012
Abstract	<p>The aim of this thesis was to compare antiradical activity of four flavonoids, quercetin, taxifolin (dihydroquercetin), rutin (quercetin-3-O-rutinoside) and isoquercitrin (quercetin-3-O-glucoside). The study examined the ability of tested compounds to scavenge superoxide radical produced by differentiated HL-60 cells via phagocyte NADPH oxidase activated by phorbol ester. HL-60 cells differentiate in response to dimethyl sulfoxide into neutrophil-like cells and this process is accompanied by induction of NADPH oxidase. The functionality of NADPH oxidase was verified by the chemiluminescent method. Antiradical activity was evaluated as the ability to suppress reduction of cytochrome c by superoxide radical. The antiradical activity of tested compounds was found to depend on their concentration and physico-chemical properties. At low concentrations, taxifolin was the most efficient superoxide radical scavenger, glycosides rutin and isoquercitrin were less efficient and the least efficient flavonoid was quercetin. On the other hand, at the highest test concentration quercetin appeared to be the most efficient superoxide scavenger. Possible cytotoxicity of tested compounds in differentiated HL-60 cells was ruled</p>

out by flow cytometric analysis of the cell cycle (sub-G1 DNA) and mitochondrial membrane potential. It is concluded that the tested flavonoids at noncytotoxic concentrations may scavenge superoxide radical produced by activated neutrophils.

Keywords	Quercetin, glycosides, dihydroquercetin, antiradical activity, oxidative burst, toxicity
Number of pages	49
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

CÍLE PRÁCE	- 10 -
1 TEORETICKÁ ČÁST	- 11 -
1.1 Reaktivní kyslíkové formy	- 12 -
1.2 Neutrofilny	- 13 -
1.2.1 Fagocytová NADPH - oxidasa	- 14 -
1.3 Biologický systém: buňky HL-60	- 15 -
1.4 Polyfenoly	- 16 -
1.4.1 Flavonoidy	- 16 -
1.5 Vlastnosti kvercetinů a jeho derivátů	- 19 -
1.5.1 Antiradikálová aktivita	- 19 -
1.6 Biologické a biochemické účinky flavonolů	- 21 -
1.6.1 Kvercetin	- 21 -
1.6.2 Taxifolin	- 24 -
1.6.3 Glykosidy kvercetinů	- 25 -
1.7 Biodostupnost flavonoidů	- 26 -
1.7.1 Absorpce kvercetinů a jeho glykosidů	- 28 -
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	- 30 -
2.1 Materiál a chemikálie	- 31 -
2.1.1 Chemikálie	- 31 -
2.1.2 Biologický materiál	- 31 -
2.1.3 Studované látky	- 32 -
2.1.4 Přístrojové vybavení	- 32 -
2.2 Metody	- 33 -
2.2.1 Kultivace a diferenciacce buněk HL-60	- 33 -
2.2.2 Měření oxidativního vzplanutí metodou luminiscence	- 34 -
2.2.3 Antiradikálová aktivita studovaných flavonoidů	- 34 -
2.2.4 Analýza buněčného cyklu v HL-60 průtokovou cytometrií	- 35 -

2.2.5	Analýza mitochondriálního membránového potenciálu v buňkách HL-60 průtokovou cytometrií	- 36 -
2.3	Výsledky a diskuze	- 37 -
2.3.1	Diferenciace buněk HL-60	- 37 -
2.3.2	Antiradikálová aktivita studovaných flavonoidů	- 39 -
2.3.3	Studium cytotoxicity studovaných látek v diferencovaných buňkách HL-60	- 40 -
3	ZÁVĚR	- 44 -
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	- 45 -
	LITERATURA	- 46 -

CÍLE PRÁCE

1. Vypracování přehledu známých informací o biodostupnosti a biologických účincích kvercetinů, taxifolinu (dihydrokvercetin) a dvou glykosidů kvercetinů, tj. isokvercitrinu (kvercetin-3-O-glukosid) a rutinu (kvercetin-3-O-rutinosid).
2. Porovnání schopnosti kvercetinů, isokvercitrinu, rutinu a taxifolinu vychytávat superoxidový radikál produkovaný při oxidativním vzplanutí diferencovaných buněk HL-60.
3. Testování cytotoxických účinků studovaných látek vůči diferencovaným buňkám HL-60.

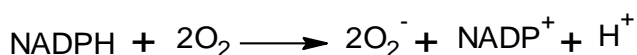
1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Reaktivní kyslíkové formy

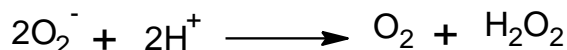
Reaktivní kyslíkové formy (ROS) jsou zapojeny v řadě patologických procesů včetně zánětů, metabolických poškození, buněčného stárnutí, aterosklerózy a karcinogeneze (Zielińska et al., 2001). Poškození vyvolává buněčné a jaderné poruchy, které vedou k apoptotické buněčné smrti (Choi et al., 2003). Oxidativní poškození je tedy spojeno s rozvojem mnoha nemocí a právě polyfenoly jsou známy svými antioxidačními účinky proti širokému spektru volných radikálů (Hapner et al., 2010).

Antioxidační látky, které mohou inhibovat tyto reaktivní kyslíkové formy, mohou také zabránit apoptóze. Apoptóza je morfologicky a biochemicky odlišná forma buněčné smrti, na rozdíl od nekrózy, charakterizovaná smršťováním buněk bez poškození buněčné membrány, kondenzací chromatinu v jádře, nenáhodnou fragmentací DNA a odstraňováním nepotřebných buněk v organismu (Choi et al., 2003).

Během fagocytózy profesionální fagocyty našeho vrozeného imunitního systému zvyšují svou spotřebu molekulárního kyslíku prostřednictvím činnosti enzymu NADPH-oxidasa, který produkuje superoxidový anion O_2^- (Dahlgren & Karlsson, 1999). Superoxid je tvořen redukcí molekulárního kyslíku prostřednictvím jednotlivých elektronů pocházejících z NADPH, tvořeného pentosafostátovou dráhou (Smith, 1994). NADPH-oxidasa katalyzuje vznik superoxidu podle rovnice:



Spontánní dismutací superoxidu je následně tvořen peroxid vodíku H_2O_2 (Babior, 2004) podle rovnice:



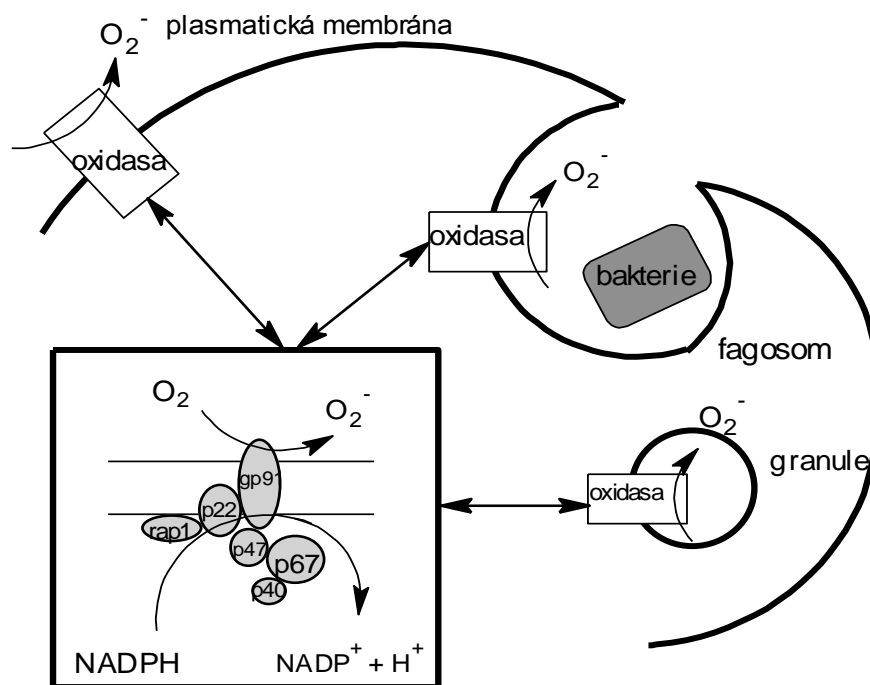
Superoxid a peroxid vodíku nejsou dostatečně reaktivní pro baktericidní účinky, avšak jejich tvorba může vést ke vzniku dalších reaktivních forem kyslíku (ROS), které jsou nejen silně antimikrobiální, ale zároveň také mohou způsobit destrukci okolní tkáně a vyvolat apoptózu u jiných buněk imunitního systému (Dahlgren & Karlsson, 1999). Mezi tyto formy patří například neradikální oxidant kyselina chlorná HOCl (Sheppard et al., 2005), která vzniká oxidací aniontů Cl^- působením peroxidu vodíku, za katalytického působení enzymu myeloperoxidasa (Babior, 2004) nebo také vysoce reaktivní

hydroxylový radikál OH^{\bullet} , vznikající Fentonovou reakcí prostřednictvím peroxidu vodíku za katalýzy přechodným kovem ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$) (Sheppard et al., 2005).

1.2 Neutrofily

Neutrofily jsou terminálně diferencované buňky bohaté na cytoplasmatické granule, které obsahují různé receptory, enzymové komponenty a antimikrobiální proteiny. Dozrávají v kostní dřeni a jsou produkovány v počtu 10^{11} buněk za den. Jejich počet se až 10 krát zvyšuje při stresu a infekci (Smith, 1994).

Jsou nezbytnou součástí vrozeného imunitního systému (Sheppard et al., 2005), hrají důležitou roli v obranyschopnosti organismu proti různým druhům infekcí, ale paradoxně díky tomu způsobují destrukční změny okolní tkáně. Ačkoliv k destrukci infekční částice dochází v intracelulárním prostředí, uvolnění cytotoxického radikálu do extracelulárního prostoru, může způsobit poškození tkáně (Obr. 1) (Smith, 1994).



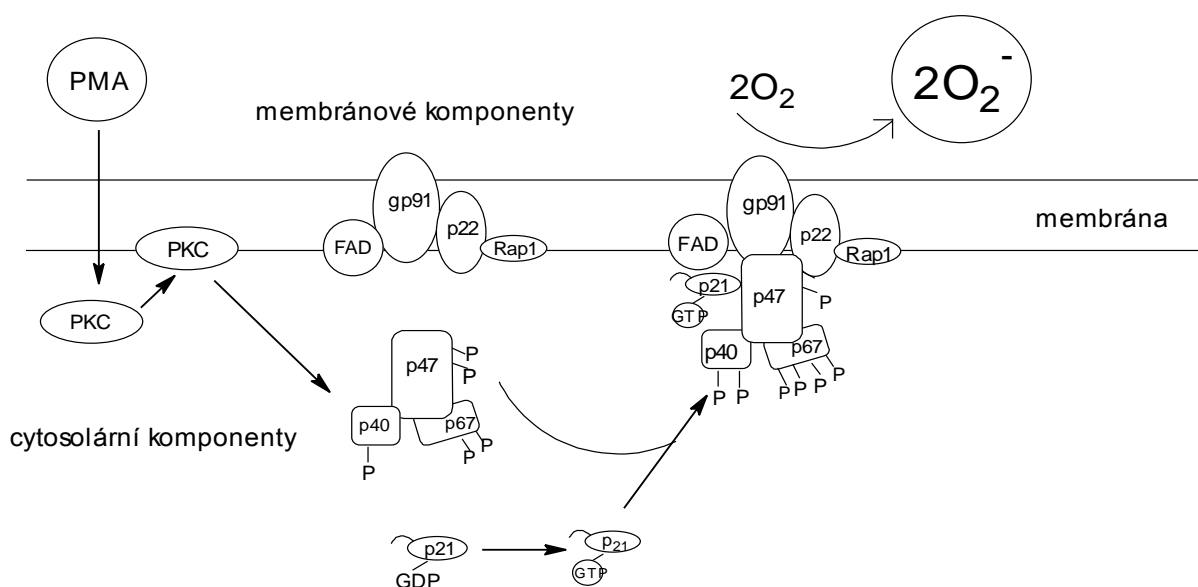
Obr. 1: **Produkce superoxidu NADPH-oxidasou neutrofilu při fagocytóze cizorodých částic** (Převzato a upraveno podle Dahlgren & Karlsson, 1999).

1.2.1 Fagocytová NADPH - oxidasa

NADPH-oxidasa je enzymový komplex, který katalyzuje produkci superoxidu z kyslíku a NADPH. Je složen ze dvou membránově vázaných podjednotek (Babior, 2004) gp91^{phox}, p22^{phox} plus malého G-proteinu Rap1 (Sheppard et al., 2005) a tří podjednotek p67^{phox}, p47^{phox} a p40^{phox} nacházejících se v cytosolu (Babior, 2004). Zkratka *phox* znamená fagocytová oxidasa (Sheppard et al., 2005).

Tento komplex je součástí mikrobicidní ochrany využívané lidskými fagocyty k eradikaci patogenů (Sheppard et al., 2005). Obsahuje redoxní centrum, cytochrom *b*₅₅₈, které transportuje elektrony z cytosolárního NADPH na extracelulární nebo intrafagosomální molekulární kyslík za vzniku superoxidu (Roos et al., 2003).

Produkce superoxidu je závislá na translokaci podjednotek oxidasy p67^{phox}, p47^{phox} a p40^{phox} z cytosolu či specifických granulí k plasmatické membráně a jejich navázání na cytochrom *b*₅₅₈. Jako odpověď na vnější podněty se oxidasa fagocytů mění z neaktivního stavu do aktivního stavu a dochází k tvorbě superoxidového radikálu v procesu tzv. oxidativního vzplanutí (Obr. 2) (Sheppard et al., 2005). Aktivace oxidasy zahrnuje fosforylaci cytosolických podjednotek (Babior, 2004).

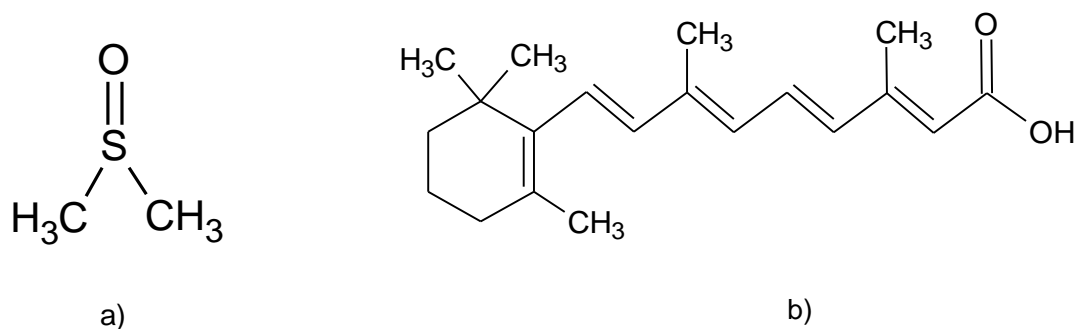


Obr. 2: **Oxidativní vzplanutí** (Převzato a upraveno podle Morena et al., 2002).

1.3 Biologický systém: buňky HL-60

Buněčná linie HL-60 odvozená od pacienta s akutní promyelocytární leukémií poskytuje modelový systém (*in vitro*) pro studium molekulárních a buněčných aktivit podléjících se na diferenciaci a proliferaci normálních a leukemických buněk. (Collins 1987).

Hlavním důvodem studia je diferenciaci různými činidly do čtyř typů buněk – granulocyty, monocyty, makrofágy a eosinofily. Diferenciaci na granulocyty probíhá nejčastěji přidáním polárního dimethylsulfoxidu (DMSO) nebo také kyseliny *trans*-retinové (Obr. 3). Většina buněk tak získá funkční, morfologické, enzymatické znaky a vnější membrána získá antigenní charakteristiku zralých granulocytů. (Collins 1987).



Obr. 3: **Strukturální vzorce látek způsobujících diferenciaci neutrofilů.**

a) dimethylsulfoxid (DMSO), b) kyselina *trans*-retinová

Flavonoid kvercetin inhibuje růst buněčné linie HL-60. Buněčný cyklus těchto buněk ovlivňuje tak, že ve vyšších koncentracích (20, 40, 60 μ M) zvyšuje počet buněk v G2/M fázi cyklu a naopak snižuje populaci buněk v G0/G1 fázi buněčného cyklu. Nemá však vliv na počet buněk v S fázi ani po 24 hod jeho působení na buňky. Jeho efekt je zde reversibilní, po odstranění kvercetinu z buněčné kultury se funkce buněk obnovují (Kang & Liang, 1997).

Antiproliferativní aktivita kvercetinu je zprostředkována prostřednictvím proteinkinasy C (PKC). Proteinkinasa C a tyrosin proteinkinasa (TPK) hrají důležitou roli v buněčném růstu, zejména v proliferaci nádorových buněk. Kvercetin výrazně inhibuje aktivitu cytosolární PKC a membránové TPK buněk HL-60. Jeho inhibiční efekt vůči nádorovým buňkám je také spojován s poklesem aktivity fosfatidylinositol kinasy

(PI) a fosfatidylinositol-4-fosfát kinasy (PIP). Při jeho vyšších koncentracích je tedy produkce PI, PIP₂ a PIP₃ téměř potlačena (Kang & Liang, 1997).

1.4 Polyfenoly

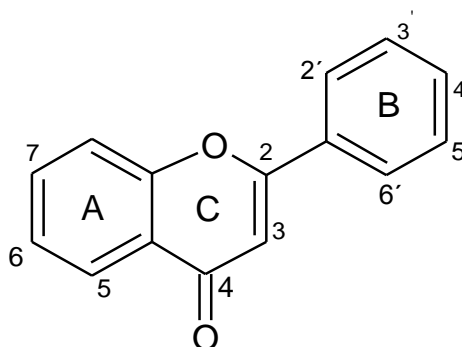
Polyfenoly jsou jednou z nejpočetnějších skupin rostlinných sekundárních metabolitů, které jsou nedílnou součástí potravy lidí a zvířat (Bravo, 1998). Jsou to redukční činidla a spolu s dalšími látkami jako jsou vitamin C, vitamin E a karotenoidy chrání tělesné tkáně proti oxidativnímu poškození. Mohou zabránit rozvoji onemocnění spojených s oxidativním poškozením jako je rakovina, záněty, kardiovaskulární onemocnění a další (Scalbert & Williamson, 2000). Jejich účinky na organismus závisí na množství jejich konzumace a na biodostupnosti (Manach et al., 2004). Právě chemická struktura polyfenolů ovlivňuje jejich biologické vlastnosti, jako jsou antioxidační aktivita, biodostupnost, specifické interakce polyfenolů s buněčnými receptory a enzymy atd. (Scalbert & Williamson, 2000).

Několik tisíc sloučenin, které mají polyfenolickou strukturu se nachází ve vyšších rostlinách a z toho několik set polyfenolických sloučenin můžeme najít v konzumovatelných rostlinách. Jejich funkce je u všech rostlin důležitá hlavně k ochraně proti UV záření a patogenům. Tyto sloučeniny můžeme rozdělit do několika skupin podle počtu fenolových kruhů a strukturních prvků spojujících tyto kruhy, a to na fenolické kyseliny, flavonoidy, stilbeny a lignany (Manach et al., 2004).

1.4.1 Flavonoidy

Flavonoidy jsou polyfenolické sloučeniny (Murakami et al., 2008), patří do skupiny nízkomolekulárních látek (Aherne & O'Brien, 2002), jejichž základní kostrou je difenylpropan C₆-C₃-C₆ (Murakami et al., 2008). Jsou složeny ze tří fenolických kruhů A, B, C. Benzenový kruh A je kondenzován s šestiuhlíkovým kruhem C, který v pozici C2 nese fenybenzenový kruh B, jako substituent (Aherne & O'Brien, 2002).

Jejich syntéza probíhá z derivátů syntetizovaných z fenylalaninu (skrz šikimátovou dráhu) a kyseliny octové. Prvním krokem je syntéza fenylalaninu z fosfoenolpyruvátu, fenylalanin je následně transformován na kyselinu trans-kořičovou, která je hydrolyzována na kyselinu kumarovou (C-9). Ta pak kondenzuje se třemi C-2 jednotkami (malonyl CoA) a tím dochází k formaci C-15 chalkonu. Následně je kruh B uzavřen a hydratace dodává hydroxylové skupiny jako je tomu například u flavonolů. Základní skelet u flavonoidů tedy tvoří 4-oxo-flavonoidové jádro (Obr. 4) (Aherne & O'Brien, 2002).



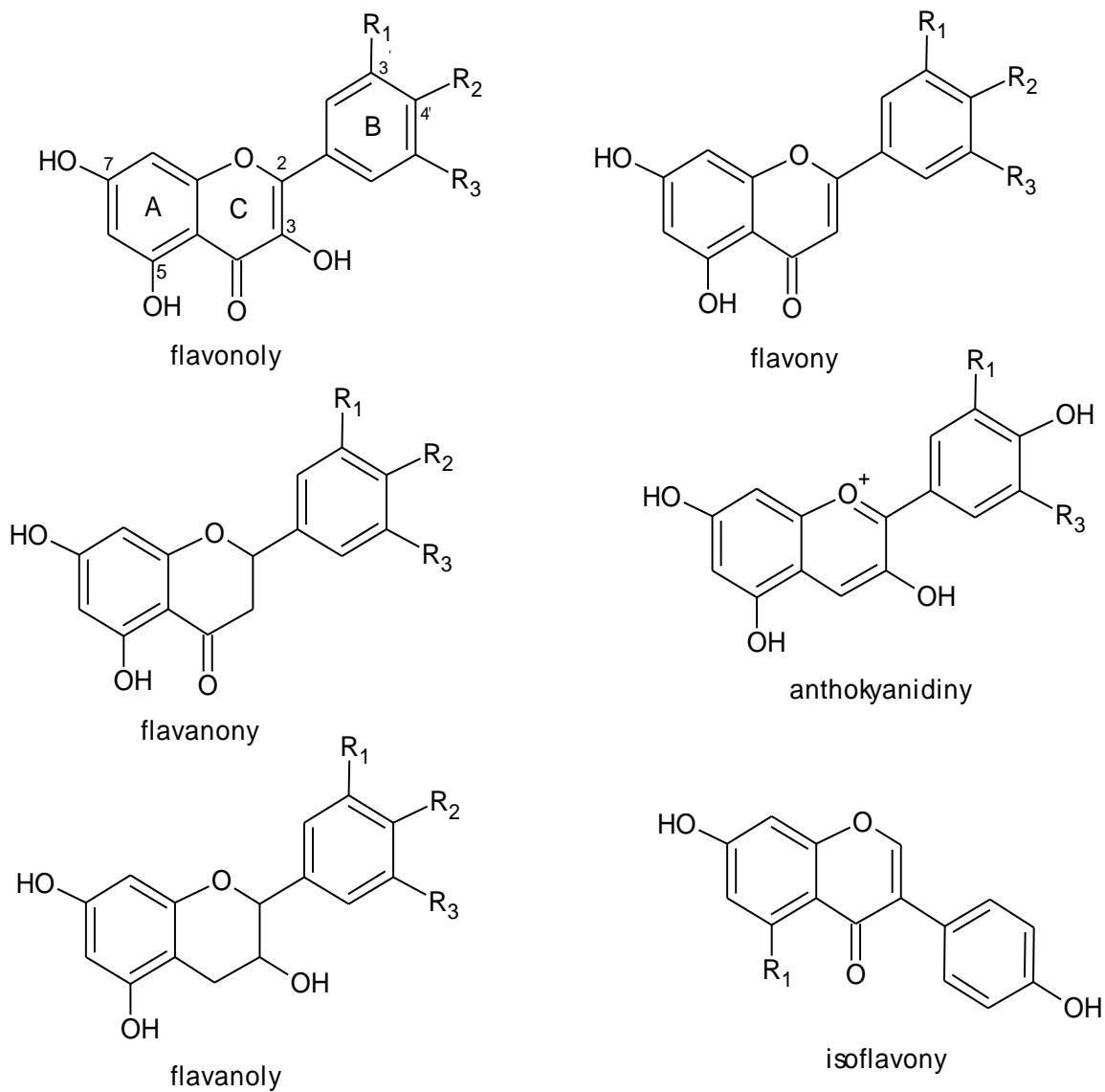
Obr. 4: **4-oxo-flavonoidové jádro** (Převzato a upraveno podle Aherne & O'Brien, 2002).

V přírodě se vyskytuje více než 4000 druhů flavonoidů, které jsou rozděleny do 6 skupin – flavonoly, flavony, flavan-3-oly (katechiny), isoflavony, flavanony, anthokyanidiny (Obr. 5) (Murakami et al., 2008)

Jsou to sloučeniny rozdílné chemické struktury a vlastností. Vyskytují se ve všech rostlinných produktech, jako jsou ovoce, zelenina, obiloviny, ořechy, ovocné šťávy atd., jsou nedílnou součástí lidské stravy (Manach et al., 2004).

Jejich schopnost vychytávat volné radikály ještě doplňuje fakt, že mohou sloužit také jako ochranné faktory proti různým typům onemocnění (Gee et al., 1998).

Flavonoidy nejsou energetickými sloučeninami a nejsou považovány za nezbytné pro organismus jako například vitamíny, ale jejich příjem má pozitivní vliv na organismus (Depeint et al., 2002).



Obr. 5: **Chemická struktura flavonoidů** (Převzato a upraveno podle Manach et al., 2004).

1.5 Vlastnosti kvercetinu a jeho derivátů

Kvercetin, dihydrokvercetin a jeho glykosylované deriváty rutin a isokvercitrin patří do skupiny flavonolů (Murakami et al., 2008).

Chemická reaktivita flavonolů a jejich metabolická přeměna je zodpovědná za antikarcinogenní efekt těchto látek. Jejich protinádorové účinky jsou připisovány různým mechanismům, jako je vychytávání volných radikálů včetně antioxidační aktivity, inhibice enzymů, které aktivují karcinogeny, změna signální transdukce a interakce s receptory a dalšími proteiny (Murakami et al., 2008).

Fyzikální vlastnosti kvercetinu a příbuzných flavonolů, jsou připisovány jeho hydrofobní planární struktuře. Planarita umožňuje konjugaci, elektronovou dislokaci a zvýšení radikální stability (Murakami et al., 2008).

Zatímco kvercetin je flavonolem v tucích rozpustným, jeho redukovaná forma dihydrokvercetin, je ve vodě rozpustný. (Chen & Deuster, 2009) Rozpustnost flavonolů ve vodě se zvyšuje s rostoucím počtem vázaných cukerných skupin (Murakami et al., 2008).

Kvercetin i od něj odvozené glykosidy vykonávají antioxidační a antiradikálovou aktivitu. Mezi těmito často užívanými termíny existuje značný rozdíl. Antiradikálová aktivita je definována jako schopnost látky reagovat s volnými radikály jednoduchou reakcí, zatímco antioxidační aktivita představuje schopnost inhibovat proces oxidace a představuje většinou souhrn několika různých reakcí, jako například při peroxidaci lipidů (Tirzitis & Bartosz, 2010).

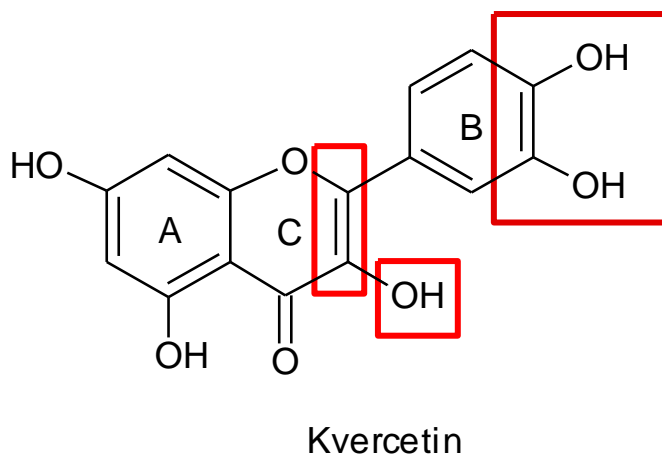
1.5.1 Antiradikálová aktivita

Vychytávání volných radikálů prostřednictvím flavonoidů je vysoce závislé na několika faktorech. Antiradikálovou aktivitu flavonoidů výrazně ovlivňuje jak poloha hydroxylových skupin, tak i jejich počet. Za tuto aktivitu jsou z velké části zodpovědné hydroxylové skupiny v poloze 3' a 4' na B kruhu, zvané také jako katecholové skupiny (Murakami et al., 2008).

Dále je aktivita flavonoidů ovlivněna přítomností volné hydroxylové skupiny na uhlíku číslo 3 v C kruhu (Obr. 6). To znamená, že blokací této 3-OH skupiny u glykosidů kvercetinu, i když hydroxylové skupiny v pozici 3', 4' v B kruhu zůstávají zachovány, se snižuje antioxidační aktivita. Kromě toho snížení počtu hydroxylových skupin nebo odstranění 3-OH skupiny ovlivňuje konformaci molekuly. Torzní úhel B

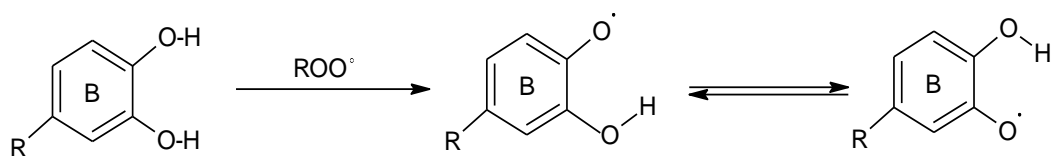
kruhu totiž také silně ovlivňuje schopnost likvidovat volné radikály (Soobrattee et al., 2005).

Díky přítomnosti fenolických hydroxylových skupin má kvercetin vlastnosti donoru elektronů (má redukční aktivitu). Tato vlastnost je základem antiradikálové aktivity, která se projevuje vychytáváním volných radikálů jako jsou superoxidový anion ($O_2^{\cdot-}$), perhydroxylový radikál (HOO^{\cdot}) a lipidové peroxylové radikály (LOO^{\cdot}) (Murakami et al., 2008).



Obr. 6: **Polohy hydroxylových skupin a dvojně vazby ovlivňující antioxidační a antiradikálovou aktivitu kvercetinu, jeho glykosidů a příbuzných flavonolů.**

Hlavním faktorem kontroly úlohy katecholové skupiny v antioxidační aktivitě je stabilizace intramolekulární vodíkové vazby fenoxylového radikálu tvořeného po zneškodnění prvního peroxylového radikálu (Obr. 7) (Pedrielli et al., 2001).



Obr. 7: **Stabilizace vodíkové vazby fenoxylového radikálu** (Převzato podle Pedrielli et al., 2001).

1.6 Biologické a biochemické účinky flavonolů

1.6.1 Kvercetin

Kvercetin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavon) (Murakami et al., 2008) disponuje celou řadou farmakologických účinků, jako je potlačení buněčné proliferace, ochrana před oxidací LDL, prevence agregace krevních destiček a indukce i prevence apoptózy (Chow et al., 2005).

Inhibuje široké spektrum proteinkinasy prostřednictvím své schopnosti kompetice s ATP o jeho vazebné místo na nukleotidu (Ruiz et al., 2007).

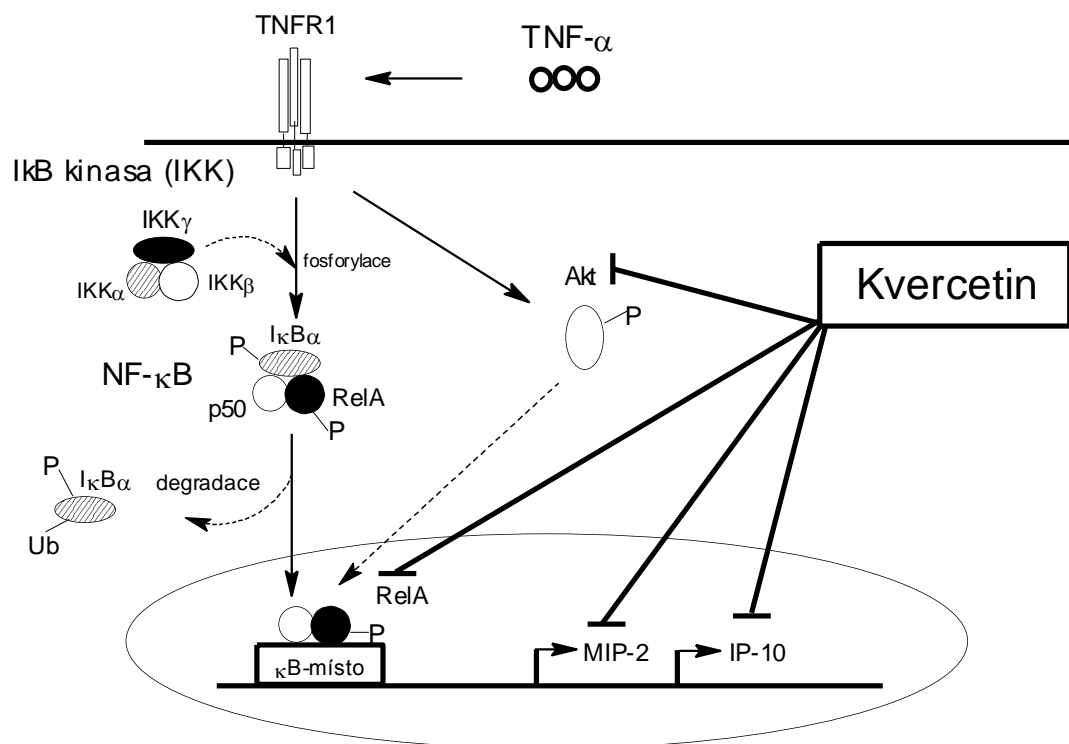
Kvercetin inhibuje cytokin TNF- α (tumor nekrotizující faktor α), který hraje významnou roli v iniciaci a udržování signální dráhy NF- κ B (Ruiz et al., 2007). NF- κ B je heterodimer sestávající z proteinových podjednotek p50 a p65 (RelA), který reguluje expresi velkého množství zánětlivých genů. Vyskytuje se v cytoplasmě v inaktivní formě ve spojení s regulačními proteiny zvanými inhibitory κ B (I κ B – α , β nebo ϵ). I κ B α je spojen s přechodnou aktivací NF- κ B. Pro aktivaci NF- κ B je nutná fosforylace I κ B α prostřednictvím I κ B kinasy (IKK), která sestává z nejméně tří podjednotek IKK α , IKK β , IKK γ (Tak & Firestein, 2001). Právě aktivace NF- κ B je považována za součást odpovědi na stres, který je vyvolán celou řadou stimulů zahrnujících růstové faktory, cytokiny jako jsou lymfokiny, chemokiny a interleukiny, UV záření atd. (Ruiz et al., 2007)

TNF- α se váže na TNF receptor 1 (TNFR1) a indukuje signální dráhu NF- κ B fosforylací Rel A na Ser536 a I κ B α na Ser32/34 (Ruiz et al., 2007). Fosforylovaný I κ B α následně podléhá ubikvitinilaci, a poté degradaci v proteasomu (Obr. 8) (Tak & Firestein, 2001).

Genetické predispozice pro gastrointestinální infekce a špatné stravovací návyky vedou k rozvoji střevních zánětlivých onemocnění, jako je Kronova choroba a ulcerativní kolitida. V těchto případech dochází právě ke zvýšené aktivitě transkripčního faktoru NF- κ B ve střevním epitelu (Ruiz et al., 2007).

Dále může kvercetin inhibovat interferon-inducibilní protein 10 (IP-10) a makrofág-zánětlivý protein MIP-2, jejichž exprese je indukována prostřednictvím TNF- α (Ruiz et al., 2007).

Naopak taxifolin, který je produktem degradace kvercetinu střevními bakteriemi v trávicím traktu, neinhibuje TNF- α indukující expresi genů IP-10 a MIP-2, což tedy poukazuje na omezenou biologickou aktivitu střevního traktu (Ruiz et al., 2007).

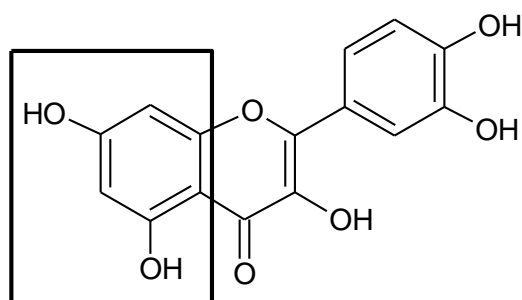


Obr. 8: **Inhibiční efekt kvercetinu** (Převzato a upraveno podle Ruiz et al., 2007).

Kvercetin zprostředkovává svůj protinádorový a protizánětlivý efekt prostřednictvím inhibice enzymu COX-2. (Nieman et al., 2007). Potlačuje promotorovou aktivitu COX-2 u buněk rakoviny tlustého stěva. Inhibuje také tyrosinkinazu, která se podílí na expresi COX-2 a hraje klíčovou roli v transformaci a proliferaci buněk (Mutoh et al., 2000).

COX-2 je enzym patří do skupiny COX (cyklooxygenasy). COX se vyskytují v organismu ve dvou isoformách - (COX-1) konstitutivní a (COX-2) indukibilní (Nieman et al., 2007). COX-1 je konstitutivně uvolňována a podílí se na udržení fyziologických funkcí, jako jsou například cytoprotektivita a průtok krve. COX-2 naopak není přítomna za normálních fyziologických podmínek (Mutoh et al., 2000), ale je exprimována při zánětu, neurodegenerativních onemocněních a rakovině (Soobrattee et al., 2000). Katalyzuje oxidaci kyseliny arachidonové, což vede k vytvoření prostaglandinů (Mutoh et al., 2000).

Společným znakem kvercetinu spolu s dalšími flavonoidy, které inhibují COX-2, je resorcinová skupina v jejich struktuře (Obr. 9), která je významným faktorem ovlivňujícím inhibici COX-2 (Mutoh et al., 2000).



Kvercetin

Obr. 9: **Resorcinová skupina kvercetinu** zodpovídající za inhibiční efekt kvercetinu vůči COX-2 (Převzato a upraveno podle Mutoh et al., 2000).

Kvercetin, flavonoidy a další látky jsou schopny se vázat na transkripční faktor PPAR γ . PPAR γ je jaderný receptor, který je spojován s diferenciací adipocytů a buněčnou kontrolou příjmu tuků. Tvoří heterodimerní DNA-vazebný komplex s receptorem kyseliny 9-cis retinové (RXR), slouží jako transkripční regulátor genů zapojený do metabolismu adipocytů a je vysoce exprimován při ateroskleróze (Nagy et al., 1998). Aktivace PPAR γ prostřednictvím flavonolů je závislá na přítomnosti dvojně vazby mezi uhlíky C2 a C3 a na pozici hydroxylové skupiny, C5 a C7 (Soobrattee et al., 2000).

Kvercetin ochraňuje buňky, jako jsou fibroblasty, kardiomyoblasty a epiteliální buňky před apoptózou. Naopak u nádorových buněk apoptózu indukuje, a to prostřednictvím aktivace kaskády kaspás 3 a potlačením exprese 70 kD heat shock proteinů Hsp70 (Chow et al., 2005).

Transkripce Hsp70 je aktivována prostřednictvím transkripčního faktoru HSF1, který je inhibován právě kvercetinem. Nadměrná exprese těchto proteinů je spojována s buněčnou obranou proti termálnímu a oxidativnímu stresu. Hsp70 zabraňují hromadění nestabilních proteinů v buňce za stresových podmínek a následně podporují reaktivaci nebo degradaci poškozených makromolekul. Inhibiční efekt kvercetinu je opět způsoben dvojnou vazbou mezi uhlíky C2 a C3. Taxifolin, u kterého tato dvojná vazba chybí, inhibici exprese Hsp70 nezpůsobuje. Proto je tato dvojná vazba limitujícím faktorem flavonolů pro vykonávání inhibice Hsp70 (Budagova et al., 2003).

Kvercetin aktivuje transkripční faktor Nrf2, který hraje klíčovou roli v expresi genů kódujících enzymy II. fáze metabolismu xenobiotik a antioxidační enzymy. Mezi tyto enzymy patří NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa-1, superoxidodismutasa,

hemoxygenasa-1, glutathionperoxidasa nebo glutationtransferasa (Surh et al., 2008). Aktivace je však závislá na přítomnosti dvojné vazby mezi uhlíky C2 a C3. Pokud vazba není přítomna, flavonol nemůže Nrf2 aktivovat, jako je tomu v případě taxifolinu. Dále substituce hydroxylové skupiny glykosidem hraje negativní roli, a proto ani glykosidy kvercetin jako jsou rutin a isokvercitrin nemohou aktivovat transkripční faktor Nrf2 (Chow et al., 2005).

1.6.2 Taxifolin

Taxifolin (dihydrokvercetin) se vyskytuje jako přírodní sloučenina nebo může také vznikat z kvercetin prostřednictvím jeho redukce střevními bakteriemi (Vrba et al., 2012).

Taxifolin vykazuje protizánětlivý efekt a chrání endoteliální buňky proti oxidativnímu poškození inhibicí exprese intracelulárních adhezních molekul (ICAM-1 a Mac-1), což jsou dva receptory zapojené do adheze a transmigrace leukocytů k endotelním buňkám. Zároveň potlačuje expresi zánětlivých proteinů (COX-2, iNOS) a cytokinů IL-1 β , TNF- α (Wang et al., 2006).

Ischemická cévní mozková příhoda úzce souvisí s nadprodukcí reaktivních kyslíkových forem, jako jsou superoxidový anion a peroxid vodíku nebo dusíkových forem, jako jsou oxid dusnatý a peroxynitrid. Po nástupu ischemie, vede energetický deficit k poruše iontové výměny a mitochondriální dysfunkci. Tyto dva jevy pak fungují jako aktivátory enzymů produkujících volné radikály, jako jsou xantin oxidasa, NADPH-oxidasa nebo NO synthasa (NOS), které způsobují nadprodukcii reaktivní kyslíkatých a dusíkatých forem (ROS, RNS). ROS i RNS poškozují tkáň atakem DNA, peroxidací lipidů nebo nitrosylací proteinů buněčných membrán či organel. V poškozených tkáních je spuštěna zánětlivá kaskáda vedoucí k expresi COX, NOS, aktivaci komplementu C5a, adhezních molekul (ICAM-1, Mac-1), infiltraci leukocytů a uvolnění cytokinů IL-1 β , TNF- α atd., které amplifikují zánětlivý proces (Wang et al., 2006).

Taxifolin také reguluje signální dráhu vedoucí k aktivaci transkripčního faktoru NF- κ B, který signalizuje expresi zánětlivých proteinů. Snižuje expresi tohoto transkripčního faktoru, který je aktivován např. právě při cévní mozkové příhodě (Wang et al., 2006).

1.6.3 Glykosidy kvercetinu

Mezi nejčastěji se vyskytující glykosidy kvercetinu patří isokvercitrin (kvercetin-3-O-glukosid) a rutin (kvercetin-3-O-rutinosid). Metabolismus těchto derivátů kvercetinu zahrnuje deglykosylaci, vzniklý aglykon pak podléhá glukuronidaci, metylaci nebo sulfataci (Vrba et al., 2012).

Flavonol rutin, ale také kvercetin způsobují blokaci oxidace lipoproteinů s nízkou hustotou (LDL) ovlivněním JAK2/STAT3 signální dráhy a signální transdukce MAP kinas. LDL v cévních stěnách jsou oxidačně poškozovány prostřednictvím volných radikálů, což způsobuje aterosklerózu, která vyúsťuje v akumulaci lipidů v cévní stěně, nekrózu a proliferaci pojivové tkáně způsobené chronickým zánětem (Choi et al., 2009). Oxidací LDL dochází k vytváření lipoperoxidačních produktů, které indukují sekreci pro-zánětlivých cytokinů a růstových faktorů téměř všemi buňkami cév (Mazière et al., 2001).

Rutin inhibuje aktivaci c-Jun transkripčního faktoru N-terminální kinasy (JNKs), čímž je tedy blokována aktivace oxidace LDL (Choi et al., 2009). JNK je protein kinasa ze skupiny MAP kinas, která fosforyluje transkripční aktivační doménu jako je c-Jun. Fosforylací tohoto transkripčního faktoru se pak zvyšuje její transkripční aktivita (Ip & Davis, 1998). Blokuje také aktivaci p38 MAPK. V případě JAK2/STAT3 signální dráhy, aktivované cytokinem IL-6, který hraje důležitou roli při spuštění akutní fáze odpovědi na poranění či zánět, rutin blokuje fosforylací transkripčního faktoru STAT3 na Tyr (Choi et al., 2009).

Rutin spolu s kvercetinem jsou známy také svým využitím jako účinné složky některých léčiv sloužících k léčbě flebosklerózy (sklerózy cév) a křehkosti cév. Bylo zjištěno, že ovlivňují kapilární permeabilitu v pořadí rutin > kvercetin a zabraňují agregaci erytrocytů. Efekt těchto sloučenin na kapiláry je ovlivněn právě přítomností volných hydroxylových skupin v pozici 3', 4' (Narayana et al., 2001).

Isokvercitrin a rutin, na rozdíl od kvercetinu, nemají v *in vitro* podmínkách významný vliv na aktivitu aryluhlovodíkového receptoru (AhR), což je transkripční faktor hrající významnou roli v regulaci exprese cytochromu P450 (CYPs) 1A1 a 1A2 (Vrba et al., 2012). Isokvercitrin i rutin však indukují expresi CYP1A v potkanech, což znamená, že jejich biologická aktivita se může projevit teprve po jejich metabolizaci, např. po deglykosylaci a uvolnění aglykonu kvercetinu (Křížková et al., 2009).

1.7 Biodostupnost flavonoidů

Kvercetin je jedním z nejvíce rozšířených flavonoidů, obsažených v ovoci a zelenině (Morand et al., 1998).

V závislosti na stravovacích návycích nebo různých zemích, činí denní dávka flavonoidů okolo 1-115 mg (Bravo, 1998). Jejich hlavními zdroji jsou čaj, víno, cibule, jablka, bobuloviny, kapusta a brokolice (Tab. 1 a 2). Celkově tedy ovoce i zelenina poskytují významná množství flavonoidů. Zeměpisné rozdíly také odpovídají velké diversitě v typu požívaných flavonoidů (Depeint et al., 2002). Převládajícími potravinovými zdroji flavonolů jsou cibule, čaj a jablka v Nizozemí, Dánsku a USA, zelený čaj v Japonsku, červené víno v Itálii a Francii nebo salát v Řecku (Aherne & O'Brien, 2002).

Flavonoly včetně kvercetinu se vyskytují nejčastěji ve formě O-glykosidů, ve kterých je nejméně jedna hydroxylová skupina nahrazena různými typy sacharidů. Cukerná složka je nejčastěji navázána v pozici 3 na C kruhu, jako je tomu u kvercitrinu, isokvercitrinu a rutinu. (Murakami et al., 2008) Charakter glykosylace ovlivňuje efektivitu absorpce kvercetinu. Jako cukerná složka se nejčastěji vyskytuje glukosa, ale také arabinosa, galaktosa, glukorhamnosa, rhamnosa a xylosa (Aherne & O'Brien, 2002).

Distribuce v rostlinách závisí na stupni osvětlení, protože tvorba flavonoidů je závislá na dostupnosti světla. Flavonoly se vyskytují zejména v buňkách listů a vnějších částech rostlinného těla jako je pokožka a kůra a jejich koncentrace se snižuje směrem k centrální části. Pouze velmi malé procento se vyskytuje v podzemních částech rostlinného těla. Tuto výraznou výjimku představuje cibule (Aherne & O'Brien, 2002).

Hlavním a důležitým zdrojem glykosidů kvercetinu je cibule. Charakteristickým znakem cibule je to, že kromě 3-glykosidů se v ní vyskytuje kvercetin, mající sacharid substituovaný v poloze 4', a to kvercetin-4'-O-β-D-glykosid (Q4'G) a kvercetin-3,4'-O-β-D-diglykosid (Q3,4'diG). Tyto glykosidy se nevyskytují v žádné jiné zelenině ani ovoci (Murakami et al., 2008).

Flavonoidy podléhají různým substitucím jako je nejčastěji glykosylace, konjugace a metylace a právě charakter těchto substitucí ovlivňuje hydrofilicitu molekul, biologické vlastnosti a zvyšuje molekulovou hmotnost flavonoidů. Glykosylace zvyšuje polaritu flavonoidů, která je nezbytná pro skladování ve vakuolách rostlinných buněk (Aherne & O'Brien, 2002).

Tab. 1: **Obsah kvercetinu v ovoci a zelenině** (Převzato a upraveno podle Aherne & O'Brien, 2002).

ovoce, zelenina	mg/100g
Bez černý	10,5-24
Borůvka	10,5-16
Brusinka	149
Brokolice	3
Cibule bílá	28-49
Rajče červené	0,5-1,1
Rajče cherry	4,1-7,4
Rybíz bílý	0,3-2,8
Rybíz černý	3,7
Rybíz červený	1,3
Hrozny bílé	1,2
Hrozny červené	1,5
Hruška	0,3-1
Jablko	2-7
Jahoda	0,8-1
Kapusta	11
Květák	0,1
Malina	0,5
Meruňka	2,5
Pórek	2
Salát hlávkový	0,2-3
Švestka	0,9
Třešně	1,5
Višně	2,3-8
Zelí bílé	0,1
Zelí červené	0,19

Tab. 2: **Obsah kvercetinu v nápojích** (Převzato a upraveno podle Aherne & O'Brien, 2002).

nápoj	mg/100ml
Jablečná šťáva	0,25
Hroznová šťáva	0,44
Grepfruitová šťáva	0,49
Citronová šťáva	0,74
Pomerančová šťáva	0,34-0,57
Rajčatová šťáva	1,3
Černý čaj	1,7-2,5
Zelený čaj	1,4-2,3
Víno červené	0,4-1,6

1.7.1 Absorpce kvercetinů a jeho glykosidů

Kvercetin se vyskytuje v potravě především ve formě β -glykosidů. Ve srovnání s kvercetinem, jsou glykosidy absorbovány pomaleji, a to z toho důvodu, že musí být nejprve deglykosylovány (Crespy et al., 2002).

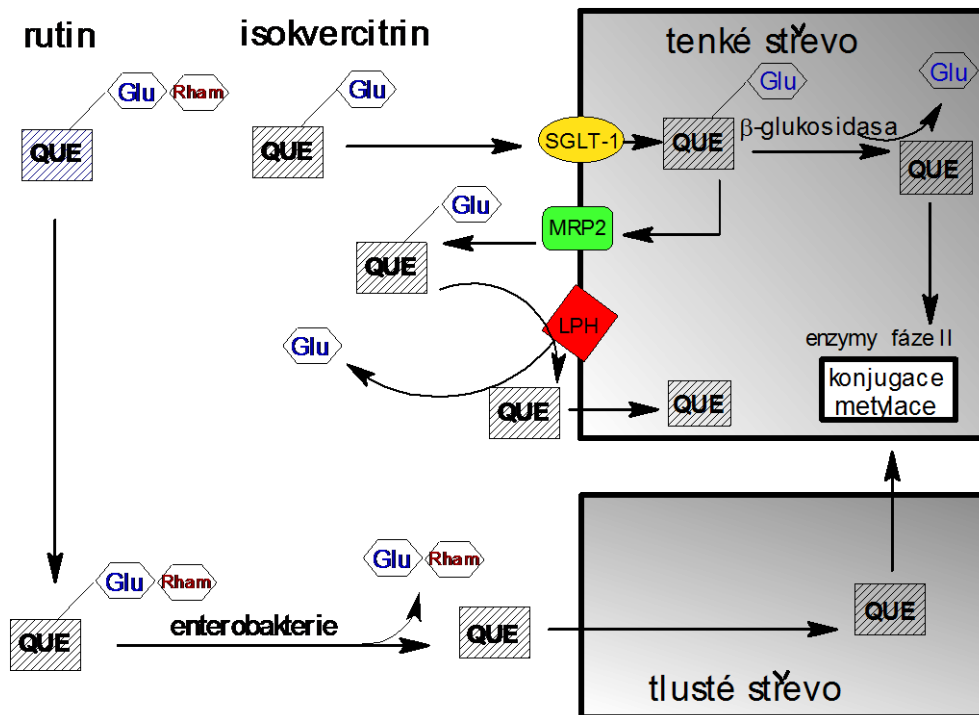
Monoglykosidy kvercetinů jako je například isokvercitrin a kvercetin-4'-O- β -D-glykosid jsou absorbovány v horní části zažívacího traktu, a to v tenkém střevě. Naopak rutin a jiné glykosidy obsahující navázaný disacharid nebo oligosacharid jsou absorbovány v dolní části zažívacího traktu, tedy v tlustém střevě.

Absorpci flavonolu předchází výše zmiňované odstranění cukerné složky (Terao et al., 2008). Ta může být hydrolyzována střevní mikroflórou nebo hydrolasami umístěnými na kartáčovém lemu tenkého střeva např. laktosa phlorizin hydrolasa, LPH (Sesink et al., 2001). Cukerná složka může být také odstraněna hydrolytickým štěpením glykosidické vazby prostřednictvím enzymu β -glukosidasy (Terao et al., 2008). Po hydrolyze může aglykon kvercetin difundovat přes membránu do buňky (Sesink et al., 2001) nebo může podléhat redukci na taxifolin prostřednictvím střevních bakterií (Ruiz et al., 2007). Případně můžou monoglykosylované flavonoly (převážně isokvercitrin) projít do buňky v intaktní formě, tedy jako neporušené glykosidy, a to prostřednictvím Na^+ -dependentního glukosového kotransportéru (SGLT-1). Uvnitř enterocytů mohou cytosolární β -glukosidasy štěpit tento glykosid (Sesink et al., 2001). Jelikož se v lidském těle nenachází enzymy α -rhmnosidasy, mohou být rutinoidy štěpeny pouze v tlustém střevě (Obr. 10), které obsahuje 10^{12} mikroorganismů/ cm^3 a má tudíž velký katalytický a hydrolytický potenciál. Mezi tyto mikroorganismy patří například *Bacteroides distasonis* (α -rhmnosidasy, β -glukosidasy), *B. ovatus* (β -glukosidasy), *Enterococcus casseliflavus*, který přeměňuje cukernou složku isokvercitrinu na mravenčan, acetát a laktát (Scalbert & Williamson, 2000).

Po deglykosylaci a absorpci, je aglykon ihned konjugován pomocí enzymů II. fáze metabolismu xenobiotik jako jsou UDP glukuronosyltransferasa, fenolsulfotranferasa, katecholmetyltransferasa. Následně tyto metabolity prochází buď přes MRP-2 protein, dostávají se do krevního řečiště a jsou distribuovány do různých orgánů (Murakami et al., 2008). Některé tyto metabolity jsou vázány na albumin a transportovány do jater prostřednictvím portální žíly (Aherne & O'Brien, 2002), kde podléhají sekundárnímu metabolismu (Murakami et al., 2008).

Pokud jsou flavonoidy přijímány pravidelně, dochází k akumulaci jejich metabolitů v celém organismu. Během zánětu jsou následně uvolněny z glukuronidové formy prostřednictvím β -glukuronidasy a podléhají dekonjugaci na aglykon. Konjugovaný kvercetin se tedy vyskytuje v krevním řečišti jako stabilní prekursor, který

může konvertovat na aktivnější aglykon a vykonávat tak svou protektivní funkci (Murakami et al., 2008).



Obr. 10: **Absorpce glykosidů kvercetinu** - rutinu a isokvercitrinu (Převzato a upraveno podle Terao et al., 2008).

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Materiál a chemikálie

2.1.1 Chemikálie

- zásobní roztok PBS ($135 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ NaCl}$, $2,7 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ KCl}$, $9 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$, $1,5 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ K}_2\text{HPO}_4$, pH 7,4)
- zásobní roztok CaCl_2 ($0,5 \text{ mol.l}^{-1}$) a MgCl_2 (1 mol.l^{-1})
- roztok PBS(+), který byl vždy čerstvě připravován z (PBS, pH 7,4; CaCl_2 $0,5 \text{ mmol.l}^{-1}$, MgCl_2 1 mmol.l^{-1} , D-glukosa. H_2O 30 mmol.l^{-1}): 100 ml PBS(+) s přídatkem 100 μl $0,5 \text{ mol.l}^{-1} \text{ CaCl}_2$, 100 μl $1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ MgCl}_2$, 0,5945 g D-glukosa. H_2O
- 2 mM MCLA v DMSO
- 10 U/ μl SOD (superoxiddismutasa) v dd H_2O : 0,334 mg SOD + 100 μl dd H_2O
- dimethylsulfoxid (DMSO)
- 2-methyl-6-(4-methoxyfenyl)-3,7-dihydroimidazo[1,2-a]pyrazin-3-on hydrochlorid (MCLA)
- 10 mmol.l^{-1} fMLP (*N*-formyl-Met-Leu-Phe) v DMSO
- 1 mmol.l^{-1} fMLP v DMSO/PBS (1:9, v/v): 100 μl 10 mmol.l^{-1} fMLP v DMSO + 900 μl PBS
- $1 \text{ mg/ml} = 1,621 \text{ mM}$ PMA (12-*O*-myristoylforbol-13-acetát) v DMSO
- $25 \text{ mg/ml} = 40,525 \text{ mmol.l}^{-1}$ PMA v DMSO: 25 μl 1 mg/ml PMA + 975 μl DMSO
- trypanová modř
- 100 μl cytochrom c/PBS+
- Triton X-100 (0,1%)
- RNAsa A (20 $\mu\text{g/ml}$)
- propidium jodid (20 $\mu\text{g/ml}$)
- 96% ethanol

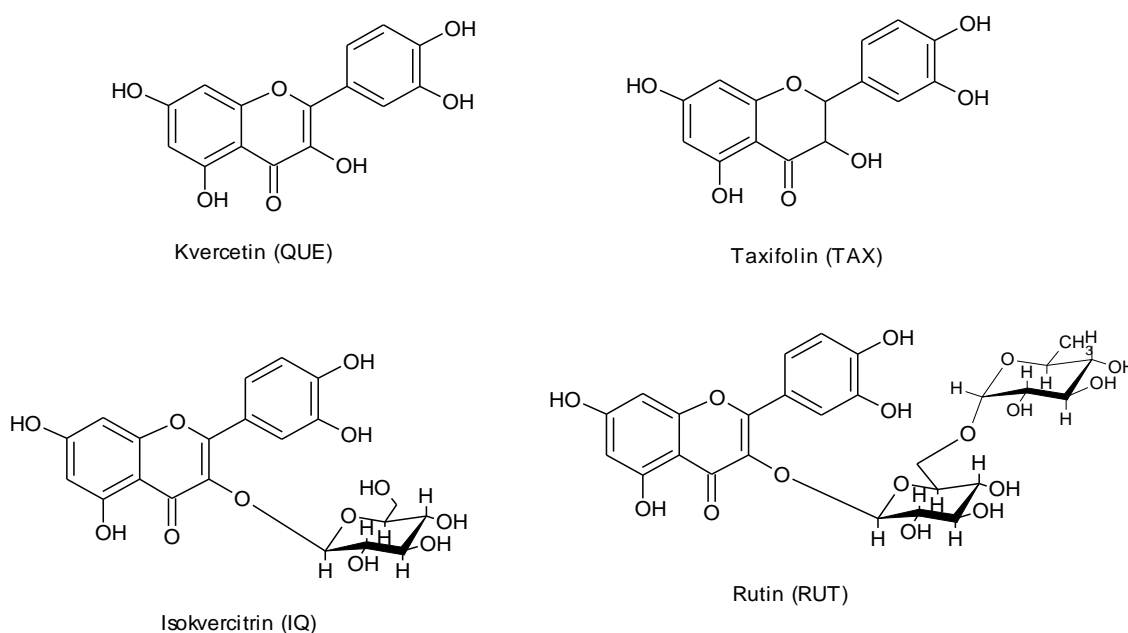
2.1.2 Biologický materiál

- HL-60 - buňky lidské promyelocytární leukémie – zakoupeny od firmy ECACC (Velká Británie)

2.1.3 Studované látky

- Kvercetin (QUE) - $C_{15}H_{10}O_7$ – zakoupen od firmy Sigma-Aldrich (USA)
- Rutin (RUT) - $C_{27}H_{30}O_{16}$ – zakoupen od firmy Merck (Brazílie)
- Isokvercitrin (IQ) – $C_{21}H_{20}O_{12}$ – připraven v Mikrobiologickém ústavu AV ČR v Praze.
- Taxifolin (TAX) – $C_{15}H_{12}O_7$ – zakoupen od firmy Amagro (Česká Republika)

Všechny tyto látky (Obr. 11) byly studovány ve čtyřech finálních koncentracích 1,10,25 a 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$.



Obr. 11: Chemická struktura testovaných sloučenin

2.1.4 Přístrojové vybavení

- Luminiscenční spektrometr *LS 50 B* (Perkin-Elmer)
- Fotometr *Sunrise Remote* (Tecan)
- Průtokový cytometr *Cytomics FC 500* (Beckman Coulter)
- Termomixér *Comfort* (Eppendorf)
- Centrifuga

- Mikroskop, Bürkerova komůrka
- Váhy, Analytické váhy
- Vortex

2.2 Metody

2.2.1 Kultivace a diferenciacie buněk HL-60

Buňky HL-60 byly pěstovány v médiu RPMI-1640 s přidavkem penicilinu, streptomycinu a fetálního hovězího séra. Buňky byly kultivovány v inkubátoru nasyceném vodními parami při teplotě 37 °C, v atmosféře 5 % CO₂ a jejich koncentrace udržována v rozmezí 10⁴ - 10⁶ buněk/ml. Před zahájením diferenciacie byly buňky odstředěny v centrifuze 3 min při 1300 rpm a přeneseny do čerstvého RPMI-1640 média. Diferenciacie byla iniciována přidáním 1,25% (v/v) DMSO a buňky byly v inkubátoru kultivovány po dobu 5 dní.

Diferenciované buňky byly nabarveny trypanovou modří a počítány na Bürkerově komůrce. K 10 µl suspenze buněk byla přidána trypanová modř v objemu 90 µl. Ze směsi bylo odebráno 10 µl a nanášeno na Bürkerovu komůrku. Buňky byly počítány pod mikroskopem a následně byla určena koncentrace živých buněk na mililitr (b/ml). Podle vypočítané koncentrace buněk bylo stanoveno množství PBS a PBS+, ve kterém byly buňky resuspendovány. Následně byly 3 min odstředěny v centrifuze při 1300 rpm, promyty v PBS, znovu centrifugovány 3 min při 1300 rpm, resuspendovány v PBS+ na koncentraci 1x10⁶ buněk/ml. Nakonec byly buňky uloženy na led. Roztok PBS+ byl připravován před každým měřením čerstvý, a to přidáním 0,5945g D-glukosy.H₂O, 100 µl 0,5 mol.l⁻¹ CaCl₂ a 100 µl 1 mol.l⁻¹ MgCl₂ do 100 ml PBS.

Vztah pro stanovení počtu živých buněk (x):

x = počet buněk x 2 (ředění) x 10 000 [b/ml]

2.2.2 Měření oxidativního vzplanutí metodou luminiscence

Při této metodě byly diferencované buňky HL-60 (dHL-60) vystaveny působení chemotaktického peptidu fMLP nebo forbolového esteru PMA, čímž došlo k aktivaci NADPH-oxidasy. Vznikající superoxidový radikál byl detekován pomocí chemiluminiscenční sondy MCLA. Sonda reaguje se superoxidovým radikálem a následně dochází k emisi světla, jehož intenzita je měřena.

Chemiluminiscence byla měřena na luminiscenčním spektrometru Perkin-Elmer, při nastavení excitační vlnové délky 350 nm a emisní vlnové délky 0 nm. Součástí luminometru byl termostat, jehož teplota byla nastavena na 37 °C.

Celý experiment probíhal tak, že do křemenné kyvety (1 cm) bylo nepipetováno 1,784 ml PBS+, které bylo vyhřáto na teplotu 37°C. Toto množství bylo stanoveno tak, aby celkový objem směsi byl 2 ml. Následně bylo přidáno 0,2 ml buněk dHL-60 a 2 µl SOD (100U/ml) jako pozitivní kontrola. Do kyvety bylo vloženo elektromagnetické míchadélko, kyveta byla vložena do termostatu luminometru a směs v kyvetě se ponechala inkubovat 5 minut. V čase 00:04:30 bylo přidáno 4µl 2 mmol.l⁻¹ MCLA v DMSO, po 20 s proběhlo měření pozadí a po dalších 10 s bylo zahájeno měření. Po 60 s od zahájení měření bylo přidáno 10 µl 1 mmol.l⁻¹ fMLP v DMSO/PBS. Intenzita luminiscence byla měřena po dobu 300 s.

V případě použití PMA, jako aktivátoru oxidativního vzplanutí, bylo použito 5µl 1 mg.ml⁻¹ PMA v DMSO a intenzita luminiscence byla měřena po dobu 600 s.

2.2.3 Antiradikálová aktivita studovaných flavonoidů

Při tomto způsobu měření byly opět použity diferencované buňky HL-60. Diferenciace proběhla výše uvedeným způsobem. Na 96-jamkovou destičku bylo napipetováno 20 µl buněk dHL-60 a k buňkám bylo připipetováno 110 µl oxidovaného cytochromu c (cyt c) v PBS+. PBS+ bylo připravováno opět čerstvé stejným způsobem, jako bylo popsáno v předchozí metodě. Oxidovaný cytochrom c, zde posloužil jako činidlo, které umožňuje měřit přítomnost O₂⁻. Roztok cytochromu c byl připraven rozpuštěním 1,2 mg pevného cyt c v 1 ml PBS+. Následně bylo přidáno 20 µl 1000x ředěného v DMSO nebo 20 µl 1000x ředěné studované látky v DMSO, tedy kvercetin, rutin, isokvercitrin nebo taxifolin v koncentracích 1, 10, 25 a 50 mmol.l⁻¹. Pro každou koncentraci, každé z testovaných látek byly použity vždy dvě jamky. První dvě jamky obsahovaly místo testované látky DMSO jako kontrolu (UT), další čtyři páry jamek sloužily pro testované látky. Do jedné jamky byly napipetovány výše uvedené

reagencie, do druhé také, ale navíc byly napipetovány 2 μl SOD. Destička byla následně vložena do termomixeru vyhřátého na 37 °C po dobu 3 min. Poté bylo do každé jamky napipetováno 50 μl PMA a ihned po přidání (A_{vz} (0 min)) byla změřena absorbance při vlnové délce 550 nm (λ_{550}). Po změření byla destička opět vložena do termomixeru na 5 min. při 1000 rpm. Po 5 minutách proběhlo druhé měření absorbance při vlnové délce 550 nm (A_{vz} (5 min)).

Inhibice cytochromu c [%] byla počítána dle následujících vztahů:

$$\Delta A_{vz} = A_{vz} (5 \text{ min}) - A_{vz} (0 \text{ min})$$

$$\Delta A_{SOD} = A_{SOD}(5 \text{ min}) - A_{SOD}(0 \text{ min})$$

$$y = \Delta A_{vz} - \Delta A_{SOD}$$

$$UT = 100 \%$$

$$\% UT = 100 \cdot y (UT) / x (QUE, RUT, IQ, TAX)$$

Vypočítaná % UT pak byla zanesena do grafu.

2.2.4 Analýza buněčného cyklu v HL-60 průtokovou cytometrií

Při analýze buněčného cyklu průtokovou cytometrií byly buňky HL-60 centrifugovány po dobu 3 min při 1300 rpm a následně resuspendovány a naředěny v 5 % sérovém mediu na koncentraci $0,5 \cdot 10^6$ buněk/ml. Poté byly buňky vysety na 6-jamkovou desku a byly k nim přidány testované látky. Do jedné jamky byly aplikovány 2 ml buněk (koncentrace $1 \cdot 10^6$ buněk/ml), 2 μl DMSO nebo 2 μl testované látky v DMSO o koncentraci 50 mmol.l⁻¹. Do 6. jamky byl místo DMSO nebo testované látky aplikován 5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ sanguinarin (SA) jako pozitivní kontrola. Následně proběhla inkubace buněk s danými látkami při teplotě 37 °C po dobu 4 hod nebo 24 hod. Po inkubaci byly buňky sesbírány zkumavek, centrifugovány 3 min při 900 rpm ve výkyvném rotoru a fixovány v 70 % etanolu. Fixace proběhla tak, že supernatant byl pečlivě odstraněn, pelet buněk resuspendován ve 100 μl chlazeného PBS a přenesen do vychlazených 1,5 ml mikrozkušavek. K buňkám v PBS bylo napipetováno 233 μl 100 % ethanolu, aby jeho výsledná koncentrace byla 70 %, a buňky byly uloženy do -80 °C.

Pro analýzu buněčného cyklu byla DNA fixovaných buněk barvena propidium jodidem. Fixované buňky byly nejprve odstředěny při 1710 rpm a teplotě 4 °C a poté

byl pelet resuspendován v 1 ml barvicího roztoku, který byl připraven smícháním 9,6 ml PBS, 10 μ l Triton X-100, 0,2 ml 1 mg/ml RNAasy A a 0,2 ml 1 mg/ml propidium jodidu. Buňky byly inkubovány 30 min v temnu a analyzovány průtokovou cytometrií.

2.2.5 Analýza mitochondriálního membránového potenciálu v buňkách HL-60 průtokovou cytometrií

Buňky HL-60 byly vysety na 12-jamkovou desku s 1 ml sérového média. K buňkám byl přidán 1 μ l DMSO nebo 1 μ l testované látky v DMSO. Buňky byly inkubovány s testovanými látkami opět po dobu 4 hod a 24 hod a po inkubaci centrifugovány v centrifuze 3 min při 110 g. Supernatant byl odsán, buňky byly nesuspendovány v 1 ml média a inkubovány po dobu 20 min při 37°C s 1 μ mol.l⁻¹ ethylesteru tetramethylrhodaminu (TMRE). Ihned po inkubaci byly buňky analyzovány na průtokovém cytometru a bylo stanoveno procento buněk se sníženým membránovým potenciálem.

2.3 Výsledky a diskuze

2.3.1 Diferenciace buněk HL-60

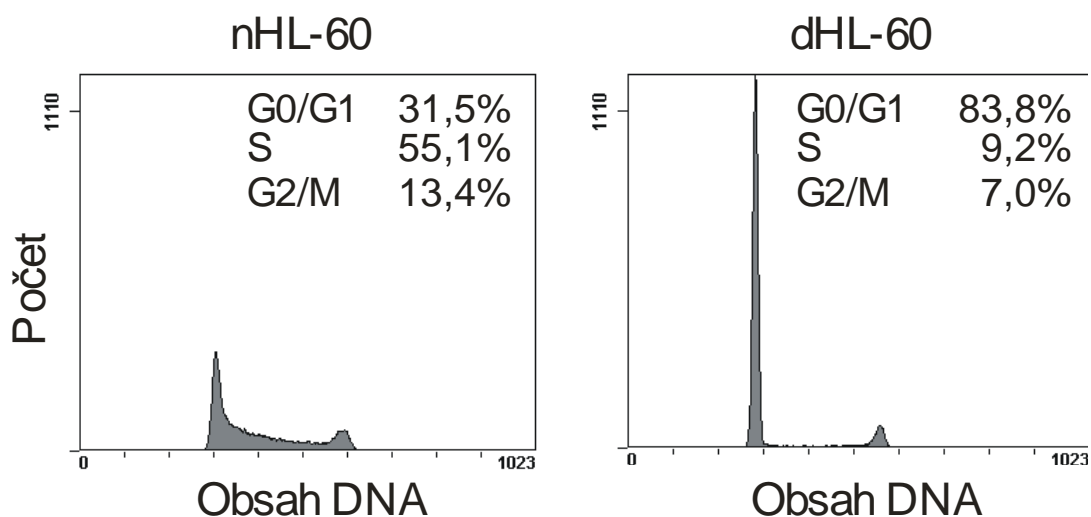
Experiment byl prováděn s diferencovanými buňkami HL-60 (dHL-60). Buňky HL-60 byly diferencovány na buňky podobné neutrofilům přidavkem 1,25% DMSO do kultivačního média (Collins, 1978).

Diferenciací přitom došlo ke změně buněčného cyklu a expresi fagocytové NADPH-oxidasy. HL-60 diferencované vlivem DMSO mají schopnost oxidativního vzplanutí, které lze vyvolat pomocí chemotaktického peptidu fMLP nebo forbolového esteru PMA (Vrba et al., 2004). Při oxidativním vzplanutí došlo k uvolnění superoxidového radikálu, který byl detekován pomocí chemiluminiscenční sondy MCLA. MCLA je vysoce citlivé chemiluminiscenční činidlo pro detekci superoxidového radikálu (Uehara et al., 1993).

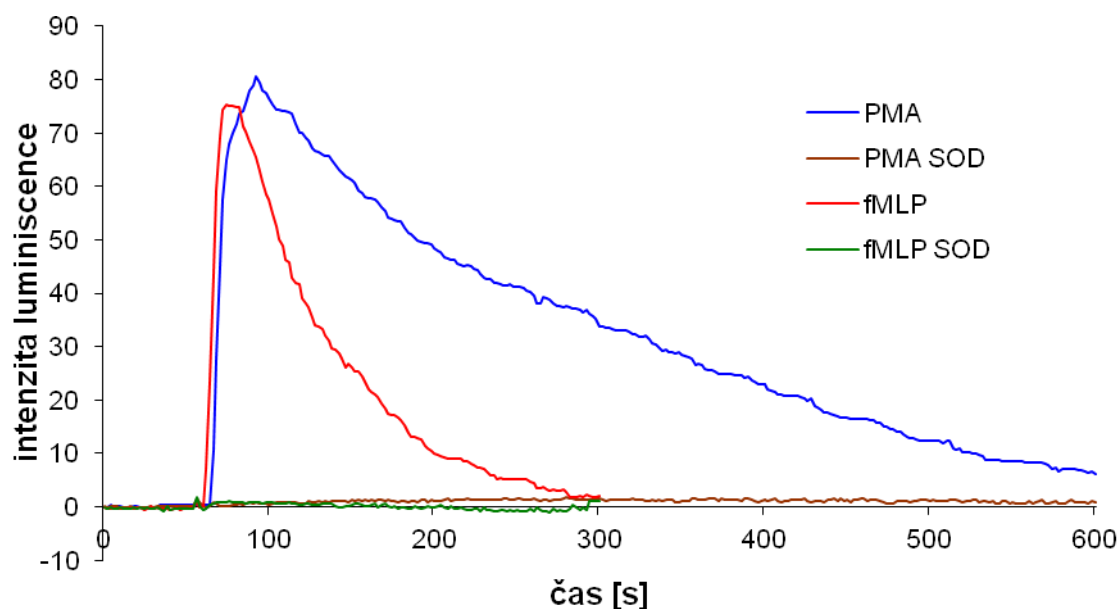
U buněk dHL-60 v tomto experimentu bylo úspěšně aktivováno oxidativní vzplanutí, které bylo detekováno na základě intenzity luminiscence. Buňky pozitivně reagovaly na stimuly fMLP a PMA, čímž byla potvrzena diferenciace buněk a funkčnost jejich NADPH-oxidasy. Jako pozitivní kontrola pro vychytávání superoxidu posloužil enzym superoxidismutasa (SOD), která je součástí přirozeného antioxidačního systému buňky (Surh et al., 2008). (Obr. 13)

Změna buněčného cyklu byla sledována prostřednictvím průtokové cytometrie. Bylo zjištěno, že po působení DMSO po dobu 5 dnů se podíl buněk HL-60 ve fázi G₀/G₁ zvýšil z 31,5% na 83,8%, naopak ve fázi S se snížil z 55,1% na 9,2% a ve fázi G₂/M z 13,4% na 7,0% (Obr. 12)

Takto diferencované buňky byly pak následně použity v dalších experimentech, tedy pro měření antiradikálové aktivity a cytotoxicity studovaných látek.



Obr. 12: Profil buněčného cyklu nediferencovaných buněk HL-60 (nHL-60) a buněk HL-60 diferencovaných po dobu 5 dnů vlivem DMSO (dHL-60).



Obr. 13: Průběh oxidativního vzplanutí diferencovaných buněk HL-60 (dHL-60) aktivovaného pomocí forbolového esteru PMA a chemotaktického peptidu fMLP, v obou případech za současného použití superoxidismutasy (SOD) jako pozitivní kontroly. Buňky HL-60, které exprimují NADPH-oxidasu produkují superoxidový anion. Aktivita a funkčnost NADPH-oxidasy se projevuje nárůstem intenzity luminescence.

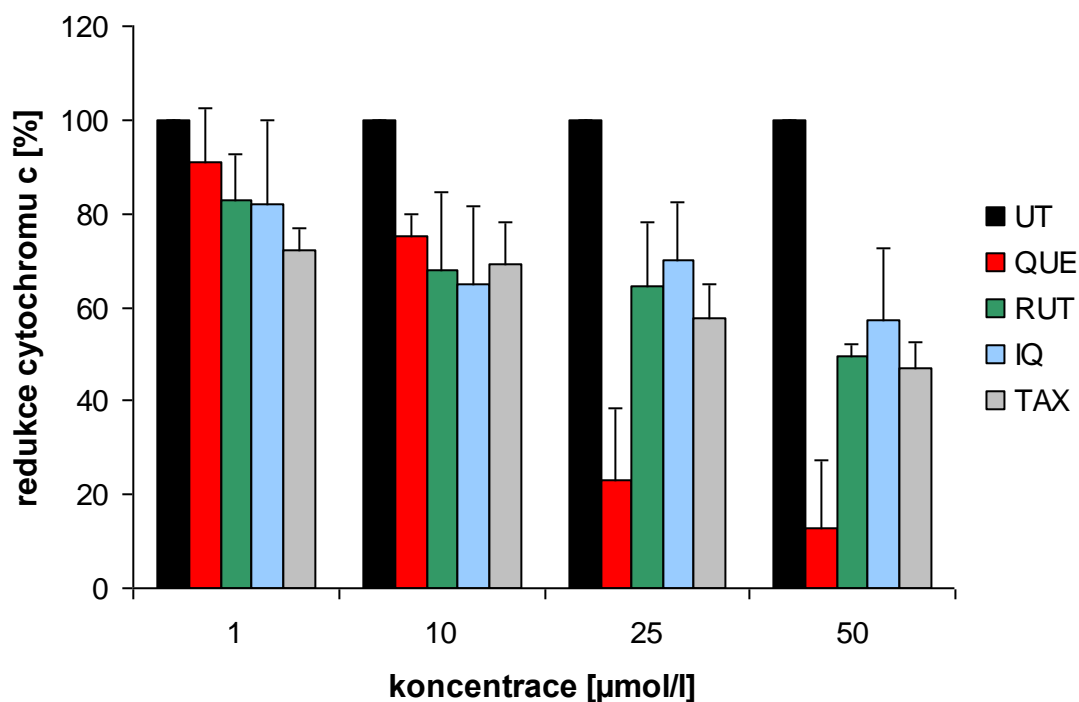
2.3.2 Antiradikálová aktivita studovaných flavonoidů

Byla porovnávána schopnost testovaných látek vychytávat superoxidový radikál produkovaný v procesu oxidativního vzplanutí vyvolaného forbolovým esterem PMA v biologickém systému – buňky HL-60.

Antiradikálová aktivita testovaných flavonoidů byla studována již dříve v různých chemických systémech (Seyoum et al., 2006).

NADPH-oxidasu buněk HL-60 byla aktivována prostřednictvím PMA, přičemž produkce superoxidu byla sledována spektrofotometricky díky jeho schopnosti redukovat oxidovaný cytochrom c. Bylo sledováno, zdali přidavek flavonoidů sníží redukci cytochromu c v důsledku vychytávání superoxidového radikálu. Při použití PMA jako iniciátoru oxidativního vzplanutí všechny čtyři testované látky do určité míry redukci cytochromu c potlačily, přičemž míra inhibice závisela na koncentraci studované látky. Při koncentraci flavonoidů $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$ byl nejúčinnějším inhibítorem taxifolin, který snížil oxidativní vzplanutí na 72,11 %, o něco méně účinné byly glykosidy isokvercitrin a rutin následované kvercetinem. Naopak při vyšších koncentracích 25 a $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ byl kvercetin nejúčinnější (Obr. 14). Při koncentraci $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ snížil kvercetin oxidativní vzplanutí na 12,83 %, druhým nejúčinnějším byl taxifolin (46,98 %) a poté až glykosidy kvercetinu – rutin (49,49 %) a isokvercitrin (57,16 %).

Rozdílná aktivita látek při různých koncentracích by mohla souviset s jejich fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Taxifolin a glykosidy kvercetinu jsou hydrofilnější než samotný kvercetin a proto by mohly ve vodném prostředí při nízké koncentraci lépe vychytávat superoxid. Větší účinek hydrofobnějšího kvercetinu při vyšších koncentracích může být vysvětlen tím, že může na rozdíl od taxifolinu, rutinu a isokvercitrinu pronikat snadněji do buňky a ovlivňovat další děje v buňce, jako je například aktivace NADPH-oxidasu (Moridani et al., 2002).



Obr. 14: Oxidativní vzplanutí diferencovaných buněk HL-60 (dHL-60) vyvolané forbolovým esterem PMA a jeho snížení prostřednictvím testovaných látek kvercetinu (QUE), rutinu (RUT), isokvercitrinu (IQ), taxifolinu (TAX). UT, kontrola.

2.3.3 Studium cytotoxicity studovaných látek v diferencovaných buňkách HL-60

U studovaných flavonoidů kvercetinu, isokvercitrinu, rutinu a taxifolinu byla hodnocena jejich možná toxicita ve vyšších koncentracích prostřednictvím analýzy buněčného cyklu diferencovaných buněk HL-60 (dHL-60).

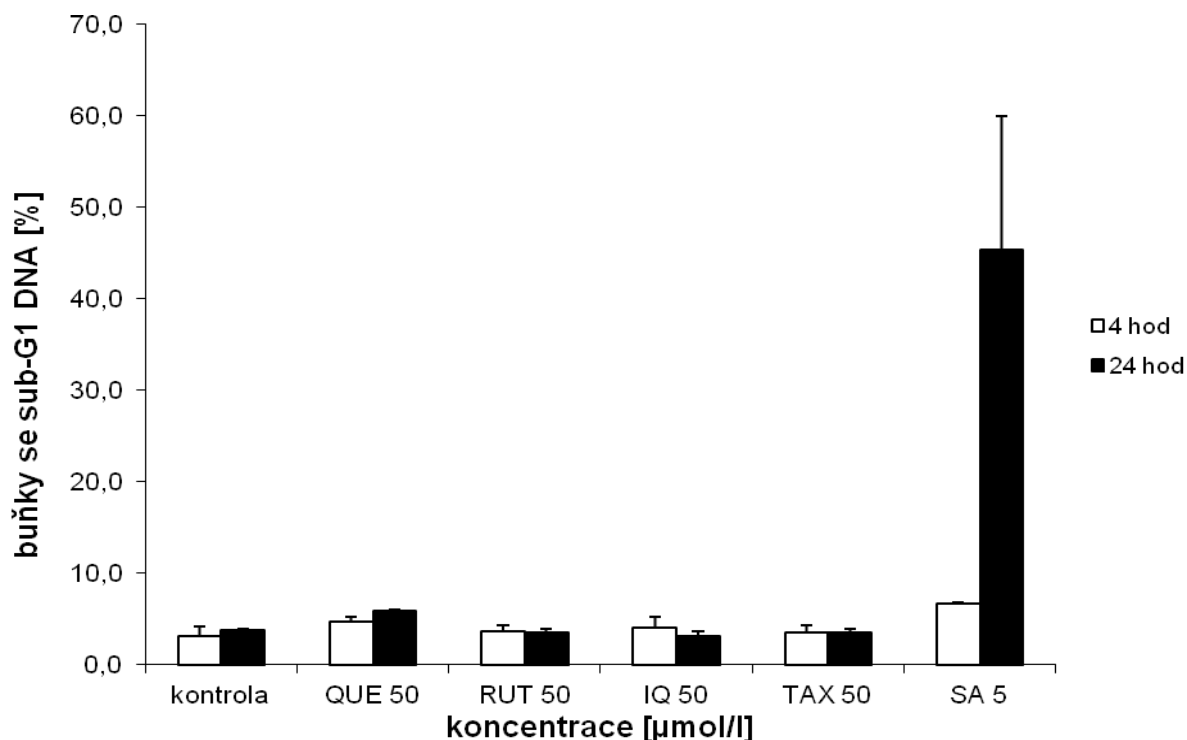
Tato možná cytotoxicita byla studována proto, aby bylo zjištěno, zda pozorované vychytávání superoxidu (snížení redukce cytochromu c) testovanými látkami není způsobeno poškozením buněk, což by se projevilo stejným způsobem.

Konkrétně bylo stanovováno množství buněk, které mají sub-G1 DNA. U nepoškozených buněk můžeme rozlišit tři fáze buněčného cyklu – G0/G1, S a G2/M. Pokud jsou však buňky nějakým způsobem poškozeny, DNA v jádře se štěpí, její obsah tedy klesá a při analýze průtokovou cytometrií se projevuje jako sub-G1 DNA. Čím více je tedy buněk se sub-G1 DNA, tím více je jich poškozeno (Darzynkiewicz et al., 1997).

Při inkubaci diferencovaných buněk HL-60 s cytotoxickým alkaloidem sanguinarinem (SA, 5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) (Kaminsky et al., 2008), sloužícím jako pozitivní kontrola, bylo zjištěno po 4 hod 6,7 % buněk se sub-G1 DNA a po 24 hod až 45,4 % buněk se sub-G1 DNA. Testované látky kvercetin, rutin, isokvercitrin i taxifolin však neměly významný vliv na fragmentaci DNA (sub-G1) ani při nejvyšší testované koncentraci látek (50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) (Tab. 3), kdy byly zjištěny pouze nepatrné změny v počtu buněk se sub-G1 DNA (Obr. 15). Je známo, že kvercetin je toxický vůči nediferencovaným buňkám HL-60 (Kang & Liang, 1997), avšak podle našich výsledků nepoškozuje diferencované buňky HL-60, což může souviset s tím, že diferencované buňky HL-60 jsou odolnější vůči mnoha cytotoxickým látkám (Solary et al., 1993).

Tab. 3: **Procento buněk HL-60 obsahující sub-G1 DNA** analyzované průtokovou cytometrií. Buňky byly vystaveny působení nejvyšší koncentrace (50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) kvercetinu (QUE), rutinu (RUT), isokvercitrinu (IQ), taxifolinu (TAX) a 5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ sanguinarinu (SA). UT, kontrola.

% buněk se sub-G1 DNA		
	4h	24h
UT	3,2	3,8
QUE 50	4,7	5,9
RUT 50	3,7	3,6
IQ 50	4,1	3,2
TAX 50	3,6	3,6
SA 5	6,7	45,4



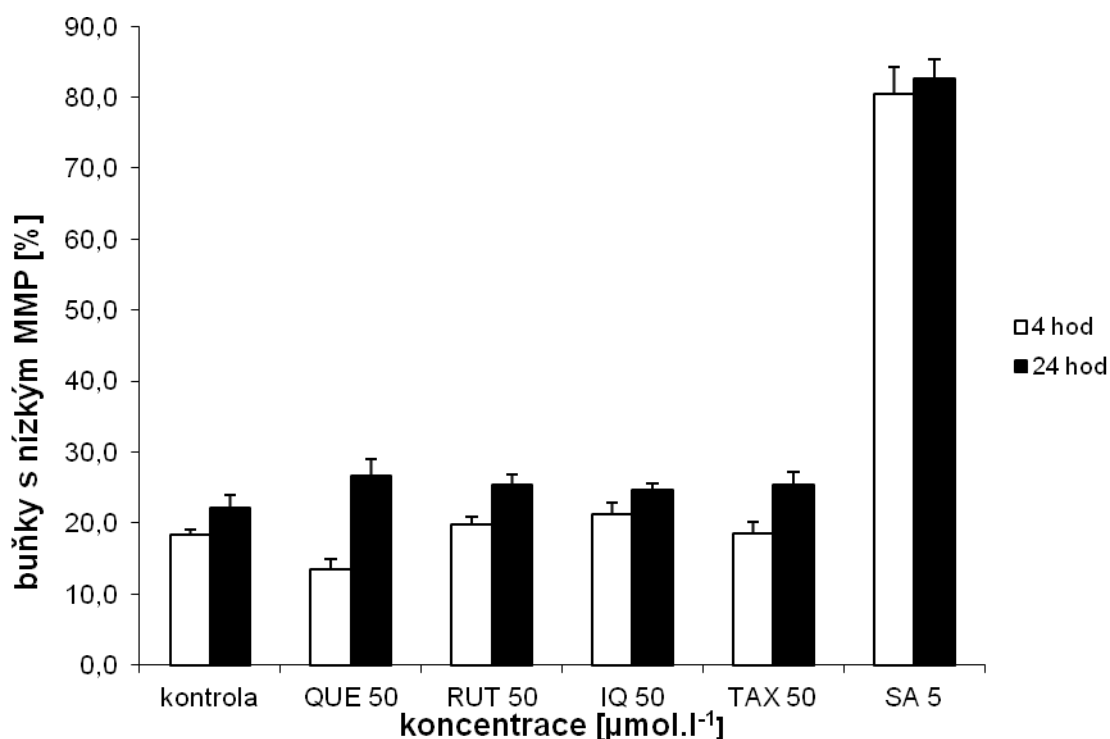
Obr. 15: **Analýza buněk se sub-G1 DNA.** Vliv testovaných látek na apoptotickou fragmentaci DNA v buňkách HL-60 diferencovaných po dobu 5 dní vlivem DMSO (dHL-60). Buňky byly inkubovány 4 hod nebo 24 hod s kvercetinem (QUE), rutinem (RUT), isokvercitrinem (IQ) a taxifolinem (TAX). Fragmentace DNA byla sledována měřením buněčného cyklu a vyjádřena jako počet buněk se sníženým obsahem DNA (sub-G1). UT, kontrola.

Pro potvrzení předchozích výsledků, byla toxicita dále hodnocena prostřednictvím analýzy mitochondriálního membránového potenciálu (MMP), neboť pokles či dokonce ztráta tohoto potenciálu patří mezi hlavní signální znaky apoptózy (Ly et al., 2003)

U testovaných flavonoidů se projevil jen nepatrné změny mitochondriálního membránového potenciálu a to i při nejvyšší koncentraci 50 μmol.l⁻¹ a inkubaci po dobu 4 hod i 24 hod. Jako pozitivní kontrola zde opět posloužil cytotoxický alkaloid sanguinarin (5 μmol.l⁻¹), který způsobil snížení mitochondriálního potenciálu u 80,5 % buněk HL-60 po 4 hod a u 82,6 % buněk HL-60 po 24 hod (Tab. 4), (Obr. 16).

Tab. 4: **Procento buněk HL-60 s nízkým mitochondriálním membránovým potenciálem (MMP)** analyzované průtokovou cytometrií. Buňky byly vystaveny působení nejvyšší koncentrace (50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) kvercetinu (QUE), rutinu (RUT), isokvercitrinu (IQ), taxifolinu (TAX) a 5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ sanguinarinu (SA). UT, kontrola.

% buněk s nízkým mitochondriálním membránovým potenciálem (MMP)		
	4h	24h
UT	18,4	22,2
QUE 50	13,6	26,7
RUT 50	19,9	25,4
IQ 50	21,3	24,7
TAX 50	18,5	25,3
SA 5	80,5	82,6



Obr. 16: **Obsah buněk s nízkým mitochondriálním membránovým potenciálem (MMP)** Buňky HL-60 diferencované po dobu 5 dní pomocí DMSO (dHL-60) byly vystaveny testovaným látkám QUE, RUT, IQ, TAX a cytotoxickému SA po dobu 4 hod a 24 hod a byl hodnocen pokles mitochondriálního membránového potenciálu těchto buněk. UT, kontrola.

3 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo porovnat antiradikálovou aktivitu flavonolu kvercetin s jeho redukovanou formou taxifolinem a glykosylovanými deriváty rutinem a isokvercitrinem. Biologickým systémem, na kterém byl experiment prováděn, byly buňky lidské promyelocytární leukemie (HL-60) diferencované po dobu 5 dnů vlivem dimethylsulfoxidu na buňky podobné neutrofilům.

Experimentem bylo zjištěno, že všechny čtyři testované látky, kvercetin, rutin, isokvercitrin i taxifolin, vychytávají superoxidový radikál tvořený aktivovanou fagocytovou NADPH-oxidase, a tím mohou snížit poškození buněk a tkání cytotoxickými reaktivními formami kyslíku, které vznikají za fyziologických podmínek ze superoxidového radikálu. Antiradikálová aktivita jednotlivých testovaných látek závisí na koncentraci dané látky a na jejích fyzikálně-chemických vlastnostech. Při nejnižší testované koncentraci ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a při aktivaci NADPH-oxidasy forbolovým esterem PMA byl nejúčinnějším inhibítorem taxifolin, méně účinné byly glykosidy isokvercitrin a rutin a nejméně účinný byl kvercetin. Při vyšších koncentracích (25 a $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) byl kvercetin naopak nejúčinnější. Z výsledků lze tedy usoudit, že všechny testované flavonoidy mají antiradikálovou aktivitu.

Případná cytotoxicita testovaných látek byla vyloučena analýzou buněčného cyklu (sub-G1 DNA) a mitochondriálního membránového potenciálu (MMP) průtokovou cytometrií. Bylo zjištěno, že látky nejsou pro diferencované buňky HL-60 cytotoxické ani při nejvyšší testované koncentraci ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$).

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

COX	cyklooxygenasa
DMSO	dimethylsulfoxid
dHL-60	buňky liské promyleocytické leukémie diferencované pomocí DMSO
fMLP	<i>N</i> -formyl-Met-Leu-Phe
HL-60	buňky lidské promyelocytické leukémie
Hsp70	70 kD-heat shock proteiny
IQ	isokvercitrin
LDL	lipoproteiny s nízkou hustotou
MCLA	2-methyl-6-(4-methoxyfenyl)-3,7- dihydroimidazo[1,2- <i>a</i>]pyrazin-3-on hydrochlorid
MAPK	mitogen activated protein kinasa
MMP	mitochondriální membránový potenciál
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NF- κ B	nukleární transkripční faktor κ B
PBS	fyzilogický roztok upravený fosfátem na pH 7,4
PI	fosfatidylinositol
PIP	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PIP ₂	fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát
PKC	proteinkinasa C
PMA	forbol-12-myristát-13-acetát
QUE	kvercetin
RNS	reaktivní dusíkaté formy
ROS	reaktivní kyslíkaté formy
RUT	rutin
SOD	superoxiddismutasa
STATs	signální transduktory a aktivátory
TAX	taxifolin
TNF- α	tumor nekrotizující faktor α
TNFR1	receptor pro TNF- α
TPK	tyrosin proteinkinasa
UT	kontrola

LITERATURA

Aherne S. A., O'Brien N. M. (2002) Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition* **18**, 75-81

Babior B. M. (2004) NADPH oxidase. *Curr. Opin. Immunol.* **16**, 42-47

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

Budagova K. R., Zhmaeva S. V., Grigor'ev A. N., Goncharova A. Ya., Kabakov A. E. (2003) Flavonoid dihydroquercetin, unlike quercetin, fails to inhibit expression of heat shock proteins under conditions of cellular stress. *Biochem.-Moscow* **68**, 1055-1061

Collins S. J. (1987) The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood* **70**, 1233-1234

Crespy V., Morand C., Besson C., Manach C., Demigne C., Remesy C. (2002) Quercetin, but not its glycosides, is absorbed from the rat stomach *J. Agr. Food Chem.* **50**, 618-621

Dahlgren C., Karlsson A. (1999) Respiratory burst in human neutrophils. *J. Immunol. Methods* **232**, 3-14

Darzynkiewicz Z., Gorczyca G. J. X. L. W., Murakami T., Traganos F. (1997) Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry* **27**, 1-20

Depeint F., Gee J. M., Williamson G., Johnson I. T. (2002) Evidence for consistent patterns between flavonoid structures and cellular activities. *P. Nutr. Soc.* **61**, 97-103

Gee J. M., DuPont M. S., Rhodes M. J. C., Johnson (1998) Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. *Free Radical Bio. Med.* **25**, 19-25

Hapner C. D., Deuster P., Chen Y. (2010) Inhibition of oxidative hemolysis by quercetin, but not other antioxidants. *Chem. Biol. Interact.* **186**, 275-279

Chen Y., Deuster P. (2009) Comparison of quercetin and dihydroquercetin: Antioxidant-independent actions on erythrocyte and platelet membrane. *Chem.-Biol. Interact.* **182**, 7-12

Choi Y. J., Kang J. S., Park J. H. Y., Lee Y. J., Choi J-S., Kang Y-H. (2003) Polyphenolic flavonoids differ in their antiapoptotic efficacy in hydrogen peroxide-treated human vascular endothelial cells. *J. Nutr.* **133**, 985-991

Choi J. S., Kang S. W., Li J., Kim L., Bae J. Y., Kim D. S., Shin S. Y., Jun J. G., Wang M. H., Kang Y. H. (2009) Blockade of oxidized LDL-triggered endothelial apoptosis by quercetin and rutin through differential signaling pathways involving JAK2. *J. Agr. Food Chem.* **57**, 2079-2086

Chow J. M., Shen S. C., Huan S. K., Lin H-Y., Chen Y. C. (2005) Quercetin, but not rutin and quercitrin, prevention of H₂O₂-induced apoptosis via anti-oxidant activity and

- heme oxygenase 1 gene expression in macrophages. *Biochem. Pharmacol.* **69**, 1839-1851
- Ip Y. T., Davis R. J. (1998) Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)-from inflammation to development. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 205-219
- Kaminsky V., Kulachkovskyy O., Stoika R. (2008) A decisive role of mitochondria in defining rate and intensity of apoptosis induction by different alkaloids. *Toxicol. Lett.* **177**, 168-181
- Kang T., Liang N. (1997) Studies on the inhibitory effect of quercetin on the growth of HL-60 leukemia cells. *Biochem. Pharmacol.* **54**, 1013-1018
- Křížková J., Burdová K., Stiborová M., Křen V., Hodek P. (2009) The effects of selected flavonoids on cytochromes P450 in rat liver and small intestine. *Interdiscipl. Toxicol.* **2**, 201-204
- Ly J. D., Grubb D. R., Lawen A. (2003) The mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) in apoptosis; an update. *Apoptosis* **8**, 115-128
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**, 727-747
- Mazière C., Conte M-A., Mazière J. C. (2001) Activation of JAK2 by the oxidative stress generated with oxidized low-density lipoprotein. *Free Radical Bio. Med.* **31**, 1334-1340
- Morand C., Crespy V., Manach C., Besson C., Demigné C., Rémésy C. (1998) Plasma metabolites of quercetin and their antioxidant properties *Am. J. Physiol.-Reg. I.* **275**, 212-219
- Morena M., Cristol J-P., Senécal L., Leray-Moragues H., Krieter D., Canaud B. (2002) Oxidative stress in hemodialysis patients: Is NADPH oxidase complex the culprit? *Kidney Int.* **61**, 109-114
- Moridani M. Y., Galati G., O'Brien P. J. (2002) Comparative quantitative structure toxicity relationships for flavonoids evaluated in isolated rat hepatocytes and HeLa tumor cells. *Chem.-Biol. Interact.* **139**, 251-264
- Murakami A., Ashida H., Terao J. (2008) Multitargeted cancer prevention by quercetin. *Cancer Lett.* **269**, 315-325
- Mutoh M., Takahashi M., Fukuda K., Matsushima-Hibiya Y., Mutoh H., Sugimura T., Wakabayashi K. (2000) Suppression of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells by chemopreventive agents with a resorcin-type structure. *Carcinogenesis* **21**, 959-963
- Nagy L., Tontonoz P., Alvarez J. G. A., Chen H., Evans R. M. (1998) Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR γ . *Cell* **93**, 229-240

- Narayana K. R., Reddy M. S., Chaluvadi M. R., Krishna D. R. (2001) Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian J. Pharmacol.* **33**, 2-16
- Nieman D. C., Henson D. A., Davis J. M., Murphy E. A., Jenkins D. P., Gross S. J., Carmichael M. D., Quindry J. C., Dumke C. L., Utter A. C., McAnulty S. R., McAnulty L. S., Triplett N. T., Mayer E. P. (2007) Quercetin's influence on exercise-induced changes in plasma cytokines and muscle and leukocyte cytokine mRNA. *J. Appl. Physiol.* **103**, 1728-1735
- Pedrielli P., Pedulli G. F., Skibsted L. H. (2001) Antioxidant mechanism of flavonoids. solvent effect on rate constant for chain-breaking reaction of quercetin and epicatechin in autoxidation of methyl linoleate. *J. Agr. Food Chem.* **49**, 3034-3040
- Roos D., Bruggen R., Meischl C. (2003) Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes Infect.* **5**, 1307-1315
- Ruiz P. A., Braune A., Hölzlwimmer G., Quintanilla-Fend L., Haller D. (2007) Quercetin inhibits TNF-induced NF- κ B transcription factor recruitment to proinflammatory gene promoters in murine intestinal epithelial cells. *J. Nutr.* **137**, 1208-1215
- Scalbert A., Williamson G. (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* **130**, 2073-2085
- Sesink A. L. A., O'Leary K. A., Hollman P. C. H. (2001) Quercetin glucuronides but not glucosides are present in human plasma after consumption of quercetin-3-glucoside or quercetin-4'-glucoside. *J. Nutr.* **131**, 1938-1941
- Seyoum A., Kaleab A., El-Fiky F. K. (2006) Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry* **67**, 2058-2070
- Sheppard F. R., Kelher M. R., Moore E. E., McLaughlin N. J. D., Banerjee A., Silliman C. C. (2005) Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *J. Leukocyte Biol.* **78**, 1025-1042
- Smith J. A. (1994) Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J. Leukocyte Biol.* **56**, 672-686
- Solary E., Bertrand R., Kohn K. W., Pommier Y. (1993) Differential induction of apoptosis in undifferentiated and differentiated HL-60 cells by DNA topoisomerase I and II inhibitors. *Blood* **81**, 1359-1368
- Soobrattee M. A., Neergheen V. S., Luximon-Ramma A., Aruoma O. I., Bahorun T. (2005) Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutat. Res.* **579**, 200-213
- Surh Y. J., Kundu J. K., Na H. K. (2008) Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. *Planta Med.* **74**, 1526-1539
- Tak P. P., Firestein G. S. (2001) NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. *J. Clin. Invest.* **107**, 7-11

Terao J., Kawai Y., Murota K. (2008) Vegetable flavonoids and cardiovascular disease. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* **17**, 291-293

Tirzitis G., Bartosz G. (2010) Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights. *Acta Biochim. Pol.* **57**, 139-142

Uehara K., Maruyama N., Huang C. K., Nakano M. The first application of a chemiluminescence probe, 2-methyl-6-[p methoxyphenyl]-3,7-dihydroimidazo[1,2-a]pyrazin-3-one (MCLA), for detecting O₂⁻ production, in vitro, from Kupffer cells stimulated by phorbol myristate acetate. *FEBS Lett.* **335**, 167-170

Vrba J., Hrbáč J., Ulrichová J., Modrianský M. (2004) Sanguinarine is a potent inhibitor of oxidative burst in DMSO-differentiated HL-60 cells by a non-redox mechanism. *Chem.-Biol. Interact.* **147**, 35-47

Vrba J., Kren V., Vacek J., Papouskova B., Ulrichova J. (2012) Quercetin, quercetin glycosides and taxifolin differ in their ability to induce AhR activation and CYP1A1 expression in HepG2 cells. *Phytother. Res.* (v tisku)

Wang Y. H., Wang W. Y., Chang C. C., Liou K. T., Sung Y. J., Liao J. F., Chen C. F., Chang S., Hou Y. C., Chou Y. C., Shen Y. C. (2006) Taxifolin ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats through its anti-oxidative effect and modulation of NF-kappa B activation. *J. Biomed Sci.* **13**, 127-141

Zielińska M., Kostrzewa A., Ignatowicz E., Budzianowski J. (2001) The flavonoids, quercetin and isorhamnetin 3-O-acylglucosides diminish neutrophil oxidative metabolism and lipid peroxidation. *Acta Biochim. Pol.* **48**, 183-189