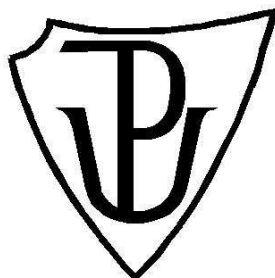


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA



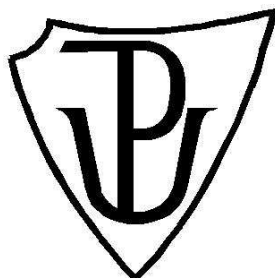
**ELEKTROCHEMICKÁ OXIDACE
FLAVONOLIGNANŮ A FLAVONOLŮ A JEJICH
BIOTRANSFORMACE *IN VITRO***

DISERTAČNÍ PRÁCE

Olomouc 2015

Martina Zatloukalová

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA



Martina Zatloukalová

**ELEKTROCHEMICKÁ OXIDACE
FLAVONOLIGNANŮ A FLAVONOLŮ A JEJICH
BIOTRANSFORMACE *IN VITRO***

DISERTAČNÍ PRÁCE

Školitel: Doc. Ing. Jan Vacek, Ph.D.

Obor: Lékařská chemie a biochemie

Disertační práce byla vypracována během prezenční formy doktorského studia na Ústavu lékařské chemie a biochemie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci v období září 2010 - leden 2015.

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury, kterou cituji. Spoluautoři souhlasí s použitím publikovaných výsledků.

V Olomouci dne

.....
Mgr. Martina Zatloukalová

Svému školiteli doc. Ing. Janu Vackovi, Ph.D. děkuji za odborné vedení, cenné připomínky, rady a předané zkušenosti během doktorského studia při výzkumné práci a při sepisování disertační práce.

Prof. Ing. Vladimíru Křenovi, DrSc. z Mikrobiologického ústavu AV ČR děkuji za poskytnutí studovaných flavonolignanů. Doc. Mgr. Martinovi Modrianskému, Ph.D. a Ing. Evě Gabrielové, Ph.D. děkuji za izolaci lidských hepatocytů, RNDr. Barboře Papouškové, Ph.D. z Katedry analytické chemie PřF UP za spolupráci při HPLC-MS analýzách. Doc. Ing. Kateřině Valentové, Ph.D. z Mikrobiologického ústavu AV ČR a Mgr. Jiřímu Vrbovi, Ph.D. za spolupráci na *in vitro* buněčných experimentech. Doc. RNDr. Martinovi Kubalovi, Ph.D. z Katedry biofyziky PřF UP děkuji za spolupráci při spektroskopických analýzách.

Prof. Dr. A. M. O. Brett děkuji za odborné vedení a podporu během studijního pobytu na Univerzitě v Coimbře, kde byla realizována část disertační práce.

Dále děkuji pracovníkům Ústavu lékařské chemie a biochemie LF UP za vytvoření dobrého pracovního prostředí a pomoc při řešení odborných problémů. Mgr. Pavlovi Kosinovi, Ph.D., prof. RNDr. Jitce Ulrichové, CSc. a prof. MUDr. RNDr. Vilímu Šimánkovi, DrSc. děkuji za cenné rady a připomínky k této disertační práci, která byla vypracována v rámci řešení projektu GACR/303/09/H048, IGA_LF_2014_014, LD14033 a FR-TI4/457.

SOUHRN

Disertační práce se zabývá studiem elektrochemické oxidace vybraných flavonolignanů, jejich interakcí s deoxyribonukleovými kyselinami a proteiny a biotransformací nově připravených galloyl derivátů kvercetinů a taxifolinů na lidských hepatocytech. Byly studovány antioxidační a prooxidační vlastnosti flavonolignanů silybinu, jeho methylovaných derivátů, 2,3-dehydrosilybinu a gallátů silybinu. Z dalších flavonoidů kvercetin, rutin, isokvercitrin a taxifolin. Oxidace polyfenolů byla studována pomocí *ex situ* a *in situ* cyklické voltametrie, diferenční pulzní voltametrie a voltametrie s vkládaným pravoúhlým napětím na elektrodě z pyrolytického grafitu a skelného uhlíku. Oxidace probíhá víceřadově a je závislá na pH prostředí. Flavonolignany a jejich deriváty reagují nekovalentní interakcí s deoxyribonukleovými kyselinami (DNA) na rozdíl od jejich reaktivních komplexů s ionty přechodných kovů, které mohou poškozovat DNA tvorbou aduktů nebo sekundární produkcí volných radikálů. V přítomnosti volných radikálů dochází k oxidativnímu poškození DNA a k fragmentaci molekuly DNA. Fragmentace DNA byla studována pomocí gelové elektroforézy a pro purifikaci poškozené DNA bylo využito magnetoseparačních technik. Získané výsledky přinesly nové poznatky o reaktivitě, stabilitě, antiradikálových resp. antioxidačních a prooxidačních vlastnostech flavonoidů, a charakteru jejich interakce s biomakromolekulami. Flavonolignany působily jako antioxidanty nejen v roztoku, ale také po vazbě na membrány erytrocytů. Interakce mezi flavonolignany a erytrocyty byla zkoumána pomocí *ex situ* voltametrie s vkládaným pravoúhlým napětím na elektrodě z pyrolytického grafitu. Na základě dosažených výsledků lze předpokládat, že flavonolignany interagují s membránami erytrocytů.

Další část disertační práce je zaměřena na identifikaci biotransformačních produktů flavonoidů 3-*O*-galloylkvercetinů a 7-*O*-galloyltaxifolinů na izolovaných lidských hepatocytech. Toxicita 3-*O*-galloylkvercetinů a 7-*O*-galloyltaxifolinů byla nejprve ověřena na myších fibroblastech a lidských hepatocytech. Pomocí hmotnostní spektrometrie bylo zjištěno, že 3-*O*-galloylkvercetin se metabolizuje přímo na glukuronidy a methyl deriváty na rozdíl od 7-*O*-galloyltaxifolinu, který se může oxidovat na galloylkvercetin, nebo štěpit na taxifolin a kyselinu gallovou s následnou glukuronidací a/nebo sulfatací. Biotransformace obou látek je doprovázena štěpením esterové vazby buněčnými enzymy. Výsledky poskytují základní pohled na biotransformaci esterů flavonoidů a mohou být použity při detailnějším studiu farmakologického potenciálu nově připravených polyfenolových látek.

Klíčová slova: flavonolignany, flavonoly, elektrochemická analýza, antioxidační aktivita, DNA interakce, erytrocyty, biotransformace.

SUMMARY

This dissertation thesis focuses on *in vitro* studies of flavonoids, their interactions with deoxyribonucleic acids (DNA) and proteins, and an analysis of the biotransformation of flavonoids by newly developed methods, especially electrochemical and mass spectrometric approaches.

First, the antioxidant and prooxidant properties of flavonolignans (silybin and its methyl-derivatives, 2,3-dehydrosilybin and silybin galloyl esters) and selected flavonols were studied by voltammetric and electrophoretic methods. The oxidation of the compounds is a pH-dependent and multistep reaction, which was studied using *ex situ/in situ* cyclic voltammetry, differential pulse voltammetry and square wave voltammetry at pyrolytic graphite and glassy carbon electrodes. Flavonolignans and their derivatives exhibit only weak non-covalent interactions with DNA in contrast to flavonolignan/metal complexes that induce DNA damage via the formation of adducts and generation of free radicals. Magnetoseparation techniques were used for the isolation and purification of DNA fragments and adducts. The results presented here provide new evidence on the reactivity, stability, antioxidant and prooxidant properties of flavonoids and their ability to interact with DNA, proteins, lipids and other biomacromolecular systems. Flavonolignans act as antioxidants, not only in solution but also after binding to erythrocyte membranes. Interactions between silymarin (or pure silybin) and erythrocytes were examined by *ex situ* square wave voltammetry using a pyrolytic graphite electrode. Based on these results, we assume that flavonolignans interact with the membranes of erythrocytes where they could modulate the redox balance in erythrocytes.

The next part of this thesis is focused on identifying the biotransformation products of the semisynthetically prepared flavonoids 3-*O*-galloylquercetin and 7-*O*-galloyltaxifolin using isolated human hepatocytes. Prior to biotransformation analysis, the cytotoxic effects of flavonoids were examined using MTT assay in mouse fibroblasts and human hepatocytes. Using mass spectrometry analysis, it was found that 3-*O*-galloylquercetin is transformed directly into glucuronides and methyl derivatives, in contrast to 7-*O*-galloyltaxifolin, which could be oxidized to galloylquercetin or deconjugated into taxifolin and gallic acid, followed by glucuronidation or sulfation. The biotransformation of both substances is accompanied by the cleavage of ester linkages by cellular enzymes. The results presented here provide a basic overview of the biotransformation of flavonoid esters and could be used in further studies on the pharmacological potential of newly designed polyphenols.

Keywords: flavonolignans, flavonols, electrochemical analysis, antioxidant capacity, DNA interactions, erythrocytes, biotransformation.

OBSAH

1. ÚVOD.....	1
2. PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY	2
2.1 Fyzikální a chemické vlastnosti polyfenolů.....	2
2.2 Základní rozdělení polyfenolů	2
2.3 Biosyntéza fenolových látek	5
2.4 Biologická aktivita polyfenolů	6
2.4.1 Antioxidační aktivita polyfenolů.....	7
2.4.2 Flavonoidy jako prooxidanty	8
2.4.3 Molekulární interakce polyfenolů	10
2.4.3.1 Interakce s enzymy.....	10
2.4.3.2 Interakce s buněčnými receptory.....	11
2.4.3.3 Interakce s lipidy	11
2.4.3.4 Interakce s DNA.....	12
2.4.4 <i>In vivo</i> studie	12
2.4.4.1 Biologická dostupnost a metabolismus polyfenolů.....	12
2.4.4.2 Biologická aktivita na experimentálních zvířatech	13
2.4.4.3 Biologická aktivita na lidech.....	13
2.5 Experimentální metody ve výzkumu polyfenolů	14
3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	18
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	19
4.1 Materiál a chemikálie	19
4.1.1 Buněčné modely.....	19
4.1.2 Chemikálie	19
4.1.3 Roztoky	20
4.1.4 Přístroje	21
4.2 Statistická analýza	23

4.3 <i>Ex situ</i> a <i>in situ</i> elektrochemická analýza flavonolignanů pomocí uhlíkových elektrod	23
4.3.2 Elektrochemické metody	23
4.3.2.1 <i>Ex situ</i> voltametrie (adsorpční přenosová (AdT) technika)	23
4.3.2.2 <i>In situ</i> voltametrie	24
4.3.2.3 Cyklická voltametrie (CV)	24
4.3.2.4 Diferenční pulzní voltametrie	24
4.3.2.5 Voltametrie s vkládaným pravoúhlým napětím	24
4.3.3 Příprava roztoků dvouvláknové DNA, jednovláknové DNA, oligonukleotidů a stanovení koncentrace	24
4.3.4 Stanovení antioxidační aktivity	25
4.3.4.1 Stanovení zhášení DPPH radikálu	25
4.3.4.2 Chemiluminiscence	25
4.3.5 Stanovení prooxidačních vlastností	26
4.3.5.1 Tvorba komplexů flavonolignan/kov	26
4.3.5.2 UV/VIS spektra komplexů flavonolignan/kov	26
4.3.5.3 Interakce s DNA	26
4.3.5.4 Dvoupovrchová technika: použití paramagnetických částic	26
4.3.5.5 Gelová elektroforéza oligonukleotidů	27
4.4 Elektrochemická analýza interakcí flavonolignanů silymarinového komplexu s membránami erytrocytů a HPLC-MS analýza metabolitů 3- <i>O</i> -galloylkvercetinů a 7- <i>O</i> -galloyltaxifolinu	28
4.4.1 Interakce flavonolignanů silymarinového komplexu s membránami erytrocytů	28
4.4.1.1 Vazba flavonolignanů na membrány erytrocytů	28
4.4.1.2 Elektrochemická analýza flavonolignanů po vazbě na membrány erytrocytů	28
4.4.2 Metabolická studie 3- <i>O</i> -galloylkvercetinů a 7- <i>O</i> -galloyltaxifolinu na lidských hepatocytech	29
4.4.2.1 Izolace lidských hepatocytů	29
4.4.2.2 Příprava suspenzních kultur lidských hepatocytů	29
4.4.2.3 Příprava primárních kultur lidských hepatocytů na experimenty	29
4.4.2.4 Příprava Balb/c 3T3 na experimenty	29
4.4.2.5 Stanovení buněčného poškození	29
4.4.2.6 Biotransformace 3- <i>O</i> -galloylkvercetinů a 7- <i>O</i> -galloyltaxifolinu na lidských hepatocytech	30

5. VÝSLEDKY32

5.1 <i>Ex situ</i> a <i>in situ</i> elektrochemická analýza flavonolignanů pomocí uhlíkových elektrod	32
5.1.1 Oxidace a adsorpce flavonolignanů na povrch elektrod	32
5.1.2 Antioxidační a chelatační vlastnosti flavonolignanů	36
5.1.3 Interakce flavonoidů s DNA	38
5.1.3.1 Elektrochemická analýza dsDNA	38
5.1.3.2 Interakce flavonolignanů s DNA	39
5.1.4 Vliv substituce gallátem na elektrochemickou oxidaci silybinu a kvercetin, antioxidační a prooxidační vlastnosti	40
5.1.4.1 Oxidace 3- <i>O</i> -galloylsilybinu a 3- <i>O</i> -galloylkvercetin	40
5.1.4.2 Antioxidační vlastnosti	44
5.1.4.3 Prooxidační vlastnosti	46
5.2 Elektrochemická analýza interakcí flavonolignanů silymarinového komplexu s membránami erytrocytů a HPLC-MS analýza metabolitů 3- <i>O</i> -galloylkvercetin a 7- <i>O</i> -galloyltaxifolinu	50
5.2.1 Interakce flavonolignanů silymarinového komplexu s membránami erytrocytů	50
5.2.2 Metabolická studie 3- <i>O</i> -galloylkvercetin a 7- <i>O</i> -galloyltaxifolinu na lidských hepatocytech	51
5.2.2.1 Toxicita 3- <i>O</i> -galloylkvercetin a 7- <i>O</i> -galloyltaxifolinu na lidských hepatocytech a Balb/c 3T3	51
5.2.2.2 HPLC-MS 3- <i>O</i> -galloylkvercetin-a 7- <i>O</i> -galloyltaxifolinu	51

6. Diskuze57

6.1 <i>Ex situ</i> a <i>in situ</i> elektrochemická analýza flavonolignanů pomocí uhlíkových elektrod	57
6.2 Elektrochemická analýza interakcí flavonolignanů silymarinového komplexu s membránami erytrocytů a HPLC-MS analýza metabolitů 3- <i>O</i> -galloylkvercetin a 7- <i>O</i> -galloyltaxifolinu	61

7. ZÁVĚR	64
8. SEZNAM PRACÍ VZTAHUJÍCÍCH SE K DISERTACI	66
9. OSTATNÍ PRÁCE	68
10. LITERATURA.....	71

SEZNAM ZKRATEK

A ^{ox}	oxidační pík adeninu	dsDNA	dvouvláknová deoxyribonukleová kyselina
AdT	adsorpční přenosová technika	EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
B.R.	Britton-Robinsonův pufr	EGTA	ethylenglykol-O,O-bis(2-aminoethyl)-N,N,N',N'tetraoctová kyselina
BSA	telecí sérový albumin	EPR	elektronová paramagnetická spektroskopie
Caco-2	buněčná linie odvozená od adenokarcinomu střeva	ESI Qq TOF MS	hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem, kvadrupólym analyzátoem a analyzátoem doby letu
CPE	uhlíková pastová elektroda	Fl	flavonolignan
CV	cyklická voltametrie	Fl-O•	fenoxylový radikál
DHSB	2,3-dehydrosilybin	Fl-M	komplex flavonolignan/kov
DMEM	Eagleovo médium modifikované Dulbeccoem	G ^{ox}	oxidační pík guaninu
DMEM/F12	DMEM s přidavkem F-12	GCE	elektroda ze skelného uhlíku
DMSO	dimethylsulfoxid	HAT	přenos atomu vodíku
DNA	deoxyribonukleová kyselina	HBBS	Hankův roztok
DPPH	1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl	HDL	lipoproteiny o vysoké hustotě
DPV	diferenční pulzní voltametrie	HEPES	N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-ethansulfonová kyselina

HepG2	buněčná linie odvozená z lidských hepatomových buněk	SB	silybin
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie	SD	směrodatná odchylka
HRP	křenuv peroxidasa	SDS	dodecylsulfát sodný
ISOM	Isomovo médium pro kultivaci lidských hepatocytů	SET	přenos elektronu
ISOSB	isosilybin	SMN	silymarin
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě	ssDNA	jednovláknová DNA
LH	lidské hepatocyty	SWV	voltametrie s vkládaným pravouhlým napětím
M	kov	TEMED	tetramethylethylendiamin
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid	TRIS	tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
PM	paramagnetické částice	UV	ultrafialová oblast spektra elektromagnetického záření
PBS	fosfátový pufr pH 7,4	VIS	viditelná oblast spectra elektromagnetického záření
PGE	elektroda z pyrolytického grafitu	WHE	Williamsovo medium E
R•	volný radikál	20MeSB	20- <i>O</i> -methylsilybin
RBC	erytrocyt	7MeSB	7- <i>O</i> -methylsilybin
RNS	reaktivní formy dusíku		
ROS	reaktivní formy kyslíku		

1. ÚVOD

Polyfenoly představují rozmanitou skupinu přírodních látek a jsou přítomny téměř u všech rostlin. Vzhledem k jejich zastoupení v ovoci a zelenině se významně podílí také na složení lidské stravy [1]. Spolu s alkaloidy a isoprenoidy je řadíme mezi sekundární metabolity. Tyto látky zastávají mnoho různých funkcí, může se jednat o látky prospěšné (slouží jako signální molekuly, pigmenty, odoranty nebo ochrana proti virům, bakteriím aj.) a/nebo degradační produkty metabolismu rostlin [2].

Rostlinné extrakty bohaté na polyfenoly jsou široce používány v tradiční a komplementární medicíně, např. silymarin (extrakt z ostropestřce mariánského) se používá jako hepatoprotektivum [3]. Polyfenoly jsou v dnešní době studovány především pro jejich protektivní účinky na lidský organismus. Potrava bohatá na polyfenoly může snižovat riziko vzniku kardiovaskulárních [4], nádorových, neurologických [5] a jiných chronických onemocnění. Mnoho prací se zabývá studiem jejich protizánětlivých, protinádorových, antibakteriálních, antimikrobiálních a antimutagenních vlastností [6]. Zmíněné biologické aktivity jsou odvozeny především od jejich antioxidačních, antiradikálových a chelatačních účinků. Při vychytávání volných radikálů polyfenoly vznikají fenoxylové radikály, které se za určitých podmínek, v přítomnosti iontů přechodných kovů, chovají prooxidačně, poškozují biomakromolekuly, DNA, proteiny a lipidy [7].

V disertační práci jsem se zaměřila na studium elektrochemické oxidace, reaktivity, stability, antioxidačních, resp. prooxidačních vlastností vybraných flavonoidů, interakci flavonolignanů silymarinového komplexu s membránami erytrocytů a na identifikaci biotransformačních produktů nově připravených derivátů kvercetinu a taxifolinu na izolovaných lidských hepatocytech.

2. PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

2.1 Fyzikální a chemické vlastnosti polyfenolů

Polyfenoly mají ve své struktuře alespoň dvě aromatická jádra substituovaná alespoň dvěma hydroxylovými skupinami [8]. Fyzikální a chemické vlastnosti polyfenolů jsou úzce spojeny s jejich reaktivitou a biologickými účinky. Hydroxylové skupiny polyfenolů jsou ve vodném prostředí ionizovány a mají vlastnosti slabých kyselin. Jsou dobrým donorem vodíku a mohou vytvářet inter- a intramolekulární vodíkové vazby, které zvyšují teplotu tání a snižují rozpustnost polyfenolů. Mohou tvořit stabilní radikály. Hydroxylové skupiny jsou schopné vytvářet koordinační vazbu s ionty kovů. Mezi další chemické vlastnosti patří *cis-trans* isomerie u jednoduchých fenylypropanoidů a jejich derivátů. Biosyntézou polyfenolových látek vznikají *trans* izomery, které jsou dále účinkem UV záření přeměněny na *cis* formu [9]. Zatímco isomerie výrazně neovlivňuje fyzikálně-chemické vlastnosti polyfenolů, některé specifické interakce s buněčnými receptory jsou na izomerii závislé. Například izomer silybinu B interaguje s estrogenovými receptory na rozdíl od izomeru A [10].

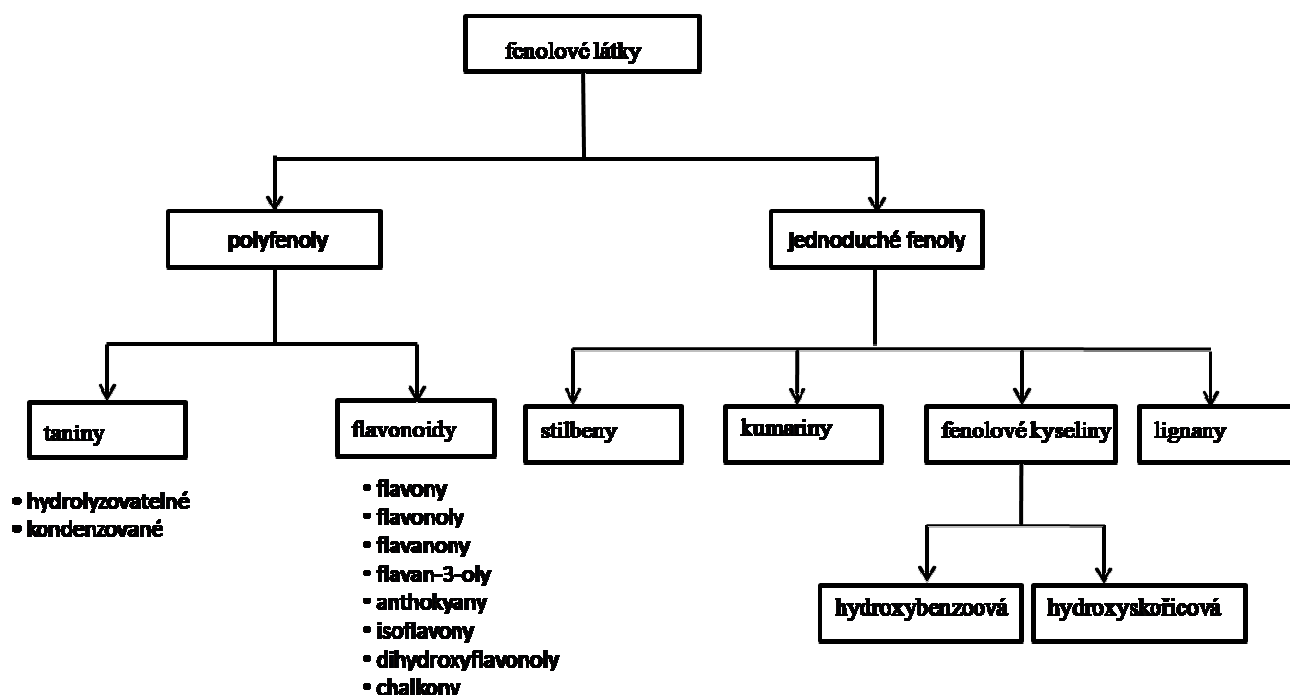
Polyfenoly jsou obvykle pevné látky. Žluté zbarvení flavonoidů, červené nebo modré anthokyaninů je způsobeno přítomností konjugovaných systémů. Mezi jejich další důležité vlastnosti patří rozpustnost, která je závislá na struktuře. S rozpustností souvisí schopnost interagovat s buněčnými membránami. Obecně platí, že prostřednictvím volné difúze mohou vstupovat do buněk snadněji hydrofobní sloučeniny než látky hydrofilní např. glykosidy. Nicméně buňky disponují dalšími aktivními transportními mechanismy usnadňujícími vstup fenolových látek [9].

2.2 Základní rozdělení polyfenolů

Polyfenoly tvoří jednu z nejpočetnějších a široce distribuovaných skupin přírodních látek. V současné době je známo více než 8000 fenolových struktur, z nichž bylo identifikováno více než 4000 flavonoidů [8, 11]. Rozmanitost a široká distribuce polyfenolů v rostlinách vede k různým způsobům dělení těchto přirozeně se vyskytujících látek. Polyfenoly mohou být klasifikovány podle rostliny, ze které byly izolovány, biologické funkce a chemické struktury. Polyfenoly v rostlinách jsou buď ve formě glykosidů nebo polymerů [8]. U *O*-glykosidů se sacharidová část váže především na hydroxylovou skupinu v pozici 3 nebo 7, zatímco u *C*-glykosidů se jedná o pozici na uhlíku C6 nebo C8 [12]. Mezi nejběžnější

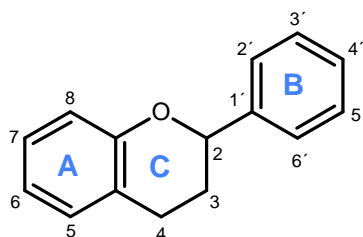
PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

cukerné jednotky patří L-ramnosa, D-glukosa, glukorhamnosa, galaktosa nebo arabinosa [13]. Pro zjednodušení je následující klasifikace polyfenolů uspořádána podle chemických struktur aglykonů (obr. 1).



Obrázek 1. Dělení fenolových látek na základě jejich struktury (upraveno podle [11]).

Jednou z nejrozšířenějších skupin polyfenolů jsou flavonoidy. Základní strukturu flavonoidů tvoří flavanový skelet (2-fenyl-benzo- γ -pyran), který se skládá z 15 atomů uhlíku, uspořádaných do tří kruhů (C6-C3-C6), označených A-C-B (obr. 2) [12, 14]. Jednotlivé flavonoidy se liší v uspořádání hydroxylových a methoxylových skupin, typem glykosidického zbytku a typem propojení mezi kruhem A a B [8].



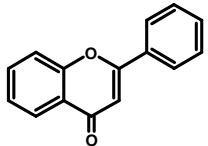
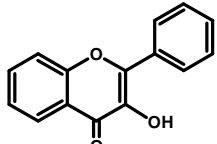
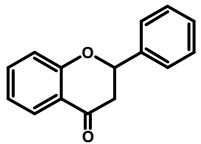
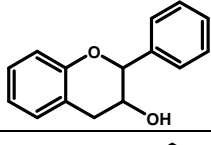
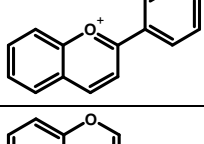
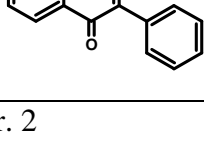
Obrázek 2. Základní skelet flavonoidů (převzato z [12, 13]).

Na základě rozdílné struktury mohou být flavonoidy rozděleny do šesti tříd: flavony, flavonoly, flavanony, flavan-3-oly, anthokyanidiny a isoflavony. Dělení je založeno především na přítomnosti (nebo nepřítomnosti) oxo skupiny v poloze C4 na kruhu C, dále

PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

na dvojně vazbě mezi uhlíkovými atomy C2 a C3 na kruhu C, a na hydroxylových substitucích kruhu B (tab.1).

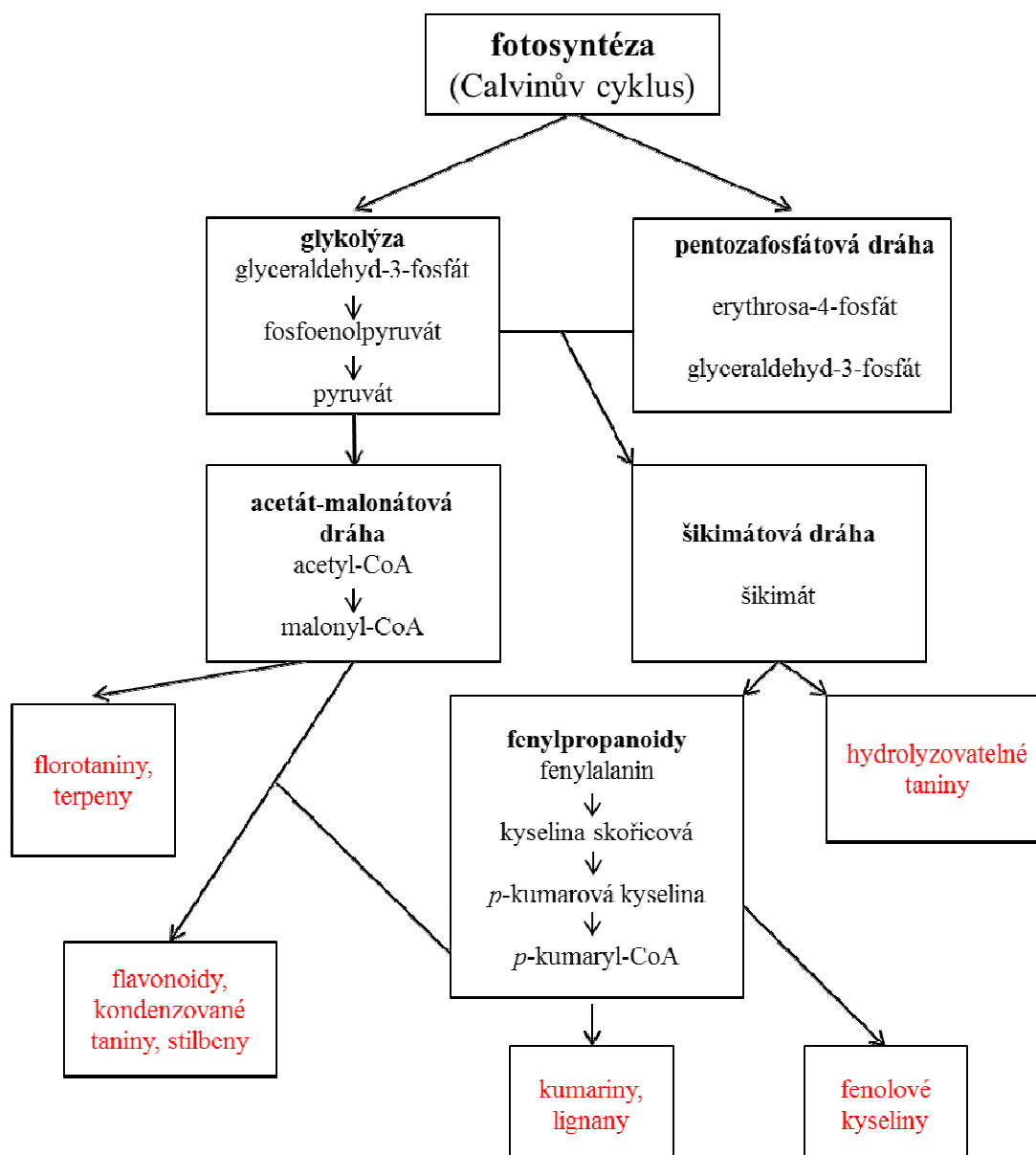
Tabulka 1. Klasifikace flavonoidů na základě jejich struktury (upraveno podle [8]).

třída flavonoidů	hlavní struktura	sloučeniny	hydroxylová substituce *
flavony		luteonin krysin	5, 7, 3', 4'-OH 5, 7 -OH
flavonoly		kvercetin kaempferol	3, 5, 7, 3', 4' -OH 3, 5, 7, 4' -OH
flavanony		naringenin taxifolin	5, 7, 4' -OH 3, 5, 7, 3', 4' -OH
flavan-3-oly		(+)-katechin (-)-epikatechin	3, 5, 7, 3', 4' -OH 3, 5, 7, 3', 4' -OH
anthokyanidiny		apigenidin kyanidin	5, 7, 4' -OH 3, 5, 7, 3', 4' -OH
isoflavony		genistein daidzein	5, 7, 4' -OH 7, 4' -OH

* pro číslování viz obr. 2

2.3 Biosyntéza fenolových látek

Stavební jednotky polyfenolů jsou odvozeny ze dvou hlavních metabolických cest, šikimátové a acetát-malonátové dráhy (obr. 3). Chloroplasty rostlinných buněk přeměňují oxid uhličitý na glycerinaldehyd-3-fosfát, který je dále transformován nebo akumulován ve formě zásobních cukrů, jako je sacharóza a škrob. Ty jsou podle potřeby využity při glykolýze (na hlavní produkty: glycerinaldehyd-3-fosfát, fosfoenolpyruvát a pyruvát) nebo v pentozafosfátové dráze (na hlavní produkty: erythrosa-4-fosfát a glycerinaldehyd-3-fosfát) [15].



Obrázek 3. Schéma biosyntézy fenolových látek (upraveno dle [15]).

Centrální úlohu v biosyntéze převážné většiny fenolových látek má fenylypropanoidová dráha. Fenylypropanoidy jsou odvozeny od fenylyalaninu, který vzniká šikimátovou cestou, kdy vzniká kyselina skořicová působením fenylyalaninamoniaklyasy [16]. Dále dochází k přeměně kyseliny skořicové na *p*-kumarovou působením 4-monooxygenasy kyseliny skořicové, následně kyselina kávová, metylací kyselina ferulová a její metylací kyselina sinapová [9].

Flavonoidy jsou pak syntetizovány z kumaryl-CoA a malonyl-CoA. Reakci katalyzuje chalkonsyntasa. Produkt reakce je tetrahydroxychalkon, který je chalkonisomerasou přeměněn na naringenin (flavanon). Naringenin je hydroxylován flavanon-3-hydroxylasou za vzniku dihydrokaempferolu (dihydroflavanol). Dihydroflavanoly jsou přeměněny flavonolsyntasou na flavonoly (kaempferol, kvercetin a myricetin). Hydroxylace kruhu B kaempferolu, naringenininu a apigeninu je katalyzována flavonoid-3'-hydroxylasou. Klíčovým metabolitem, z něhož vznikají anthokyanidiny, je dihydroflavanol (např. dihydrokaempferol-4-reduktasa je enzym přeměňující dihydrokaempferol na leukopelargonidin). Specifické glykosyltransferasy a acyltransferasy přeměňují anthokyanidiny na anthokyaniny. 2-hydroxyisoflavony vznikají oxidací flavanonů katalyzovanou cytochromem P-450 a následně podléhají dehydrataci za vzniku isoflavonů [9].

2.4 Biologická aktivita polyfenolů

Polyfenoly vykazují široké spektrum biologických aktivit, protizánětlivou [17, 18], antibakteriální [13], antivirální [13, 17], hepatoprotektivní [13] či protinádorovou [19, 20]. Jejich ochranný účinek, např. resveratrolu, se uplatňuje také u některých neurologických onemocnění [21]. Mají kardioprotektivní a antidiabetický (např. katechiny [22], anthokyaniny [23]) potenciál. Zmíněné biologické aktivity jsou především dány jejich antioxidačními a antiradikálovými účinky, chelatační aktivitou a jejich specifickou vazbou na buněčné receptory. Buněčné kultury se často používají ke studiu účinků polyfenolů a poskytují mnohé důležité výsledky. Nicméně při interpretaci se musí zohlednit následující aspekty. Při kultivačních podmínkách mohou být buňky vystaveny stavu hypoxie. Oxidativní stres může různými způsoby ovlivňovat jejich vlastnosti např. proliferaci. Používaná kultivační média jsou často deficitní na antioxidanty, především na tokoferol a askorbát, což může vést k neadekvátní interpretaci antioxidační kapacity polyfenolů. Také je popsáno, že polyfenoly ve vysokých koncentracích nejsou stabilní v kultivačním médiu. Může dojít k jejich oxidaci,

kdy vznikají reaktivní oxidační produkty (chinony, semichinony, H_2O_2). Falešně pozitivní výsledky mohou být monitorovány např. při testování genotoxicity *in vitro* [24].

2.4.1 Antioxidační aktivita polyfenolů

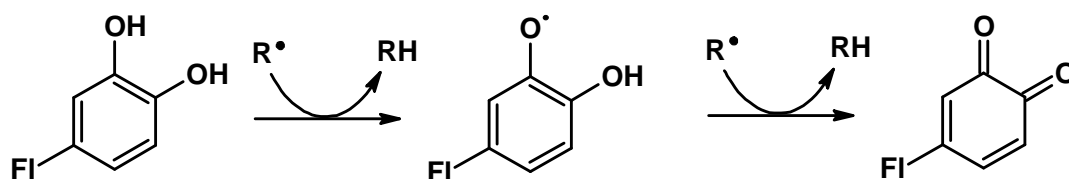
Antioxidační resp. antiradikálová aktivita závisí na uspořádání jednotlivých funkčních skupin na základním flavanovém jádře. Kromě konfigurace, dalších substitucí a celkového počtu hydroxylových skupin ovlivňuje antioxidační aktivitu také přítomnost, pozice, struktura a celkový počet cukerných zbytků [13]. Aglykony se považují za účinnější antioxidanty než jejich glykosidy [25]. Zvyšující se stupeň polymerizace zvyšuje účinnost prokyanidinů vůči různým radikálovým formám, např. prokyanidinové heptamery a hexamery jsou účinnějšími vychytávači superoxidového aniontu než monomery [26].

Mechanismus antioxidačních účinků flavonoidů zahrnuje:

1. inhibici enzymů regulujících tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS), např. xantinoxidasa, cyklooxygenasy 1,2 a lipoxygenasy,
2. schopnost vázat volné ionty kovů (Fe^{3+} , Cu^{2+}),
3. zvýšenou expresi genů antioxidačních enzymů,
4. přímé vychytávání ROS.

Vychytávání ROS

V posledních letech se intenzivně studuje vychytávání volných radikálů polyfenoly. Vychytávání volných radikálů je spojeno se schopností polyfenolů poskytovat radikálům elektron a proton (obr. 4).



Obrázek 4. Schéma vychytávání volných radikálů (R^\bullet) fenolovými látkami za vzniku fenoxylového radikálu ($Fl-O^\bullet$). Fenoxylový radikál dále podléhá reakci za vzniku chinoidní struktury (převzato z [13, 14]).

PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

Jsou navrhovány čtyři různé mechanismy, kdy tři z nich probíhají HAT mechanismem (přenos atomu vodíku) paralelně se SET (přenos elektronu) [14, 27-29] a čtvrtý vychází z teorie vzniku komplexu [30]. Mezi hlavní strukturní rysy flavonoidů potřebné pro účinné vychytávání ROS prostřednictvím HAT mechanismu patří [7, 14]:

- ortho-dihydroxy (catecholová) skupina na kruhu B,
- konjugovaná dvojná vazba mezi 2. a 3. uhlíkem a oxo skupinou na kruhu C,
- hydroxylové skupiny na uhlíku C3 a C5.

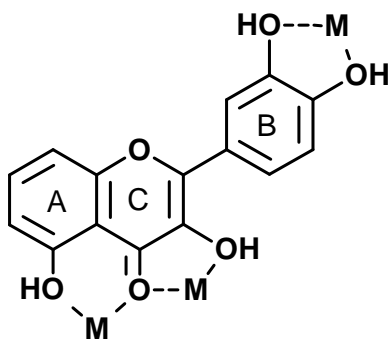
Podle předešlých kritérií jsou flavonoly, především kvercetin a myricetin, řazeny mezi účinné vychytávače radikálů ve vodném prostředí [31].

Schopnost vázat ionty kovů

Při posuzování celkové antioxidační kapacity polyfenolů hraje důležitou roli také jejich chelatace iontů přechodných kovů. Ty mohou katalyzovat rozklad peroxidu vodíku na hydroxylový radikál (Fentonova reakce):



Schopnost polyfenolů tvořit komplexy s ionty kovů závisí na jejich struktuře, vazebná místa (catecholová skupina na kruhu B, hydroxylová skupina na uhlíku C3 v konjugaci s oxo skupinou na kruhu C, hydroxylová skupina na 5. uhlíku v konjugaci s oxo skupinou na kruhu C) jsou ukázány na obr. 5.



Obrázek 5. Možná vazebná místa iontů kovů [13].

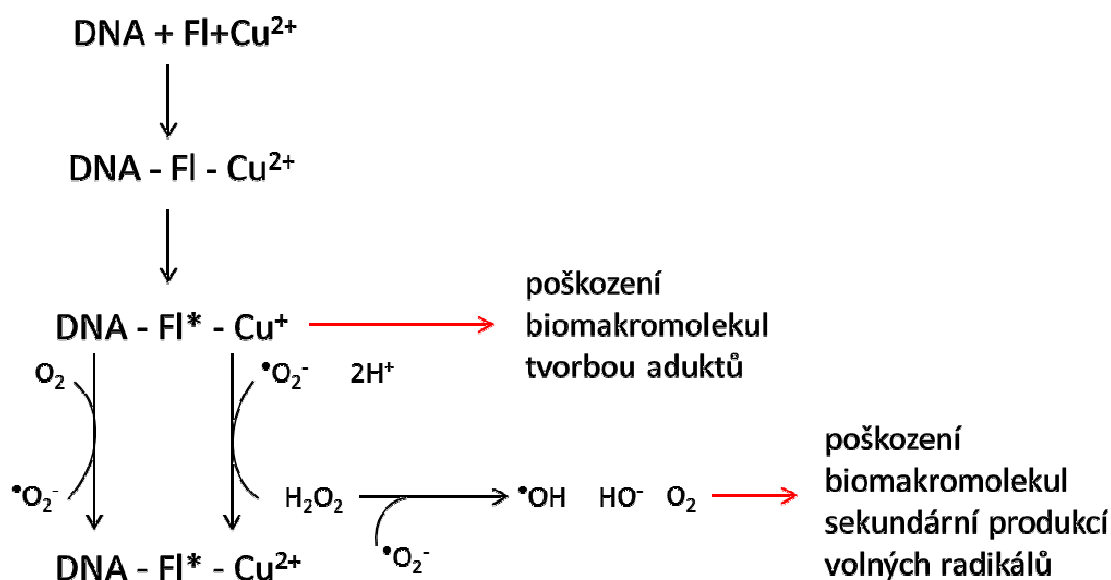
2.4.2 Flavonoidy jako prooxidanty

Polyfenoly jsou studovány především pro svou antioxidační kapacitu. Ta je díky jejich nízké biologické dostupnosti jen ojediněle popisována v podmínkách *in vivo* [32], na rozdíl od prooxidačních vlastností těchto látek, které jsou pravděpodobně zodpovědné za cytotoxicitu a proapoptotický účinek. V přítomnosti volných radikálů může docházet

PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

k poškození deoxyribonukleových kyselin (DNA), proteinů a lipidů. Je známo, že stejné strukturální znaky, které zvyšují antioxidační kapacitu, hrají u flavonolignanů klíčovou roli při navození oxidačního stresu a poškození biomakromolekul [7].

Ionty kovů jsou v organismu vázány např. na proteiny (složky hemoproteinů a kofaktorů enzymů, včetně těch, které jsou součástí antioxidační ochrany např. katalasa obsahující železo, ceruloplasmin měď a superoxiddismutasa měď a zinek) a nejsou tedy schopny se zapojovat do radikálových reakcí. Při poškození tkání např. reaktivními formami kyslíku/dusíku (ROS/RNS) nebo při snížení pH (fagocytóza, zánět, ischemie) může dojít k jejich uvolnění. Flavonolignany jsou schopny vázat ionty kovů. Tyto komplexy se za určitých podmínek stávají toxickými pro organismus a mohou poškozovat DNA, proteiny a lipidy. Navíc v přítomnosti kyslíku nebo peroxidu vodíku dochází k tvorbě reaktivních hydroxylových radikálů, které opět mohou poškozovat biomakromolekuly (obr. 6) [7].



Obrázek 6. Schéma prooxidačního působení flavonoidů v přítomnosti měďnatých kationtů; Fl: flavonoid, M: kov, Fl*: oxidovaná forma flavonoidů (upraveno dle [33]).

Bylo zjištěno, že se zvyšující se koncentrací flavonoidů kvercetinu, naringeninu, hesperetinu a morinu roste oxidativní poškození DNA v přítomnosti $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$ [34]. Také se uvádí, že látky s jednou nebo dvěma hydroxylovými skupinami vykazují nižší prooxidační aktivitu než látky s vyšším počtem hydroxylových skupin [35, 36]. Dvojná vazba mezi 2. a 3. uhlíkem a oxoskupina na 4. uhlíku mohou zvyšovat tvorbu ROS v přítomnosti Cu^{2+}

a kyslíku [7]. Glykosylace a methylace hydroxylových skupin snižuje prooxidační vlastnosti flavonoidů [35].

Při vychytávání ROS flavonoidy vznikají reaktivní fenoxylové radikály s dobou života kolem 200 μ s [37]. Pro svoji reaktivitu jsou následně oxidovány na stabilnější chinony, a ty jsou stabilizovány konjugací s nukleofily jako je glutathion [38], cystein [39] nebo nukleové kyseliny [40, 41]. Fenoxylové radikály odvozené od apigeninu, naringeninu a naringinu jsou schopny rychle oxidovat NADH, což vede ke zvýšenému příjmu kyslíku a následné tvorbě superoxidu [42]. Jiným mechanismem prooxidačního působení je interakce fenoxylového radikálu s kyslíkem v přítomnosti vysoké koncentrace iontů přechodných kovů za tvorby chinonů a superoxidu [43]. Fenoxylové radikály mohou také vznikat za určitých podmínek autooxidací, což vede opět k tvorbě superoxidu a následnému poškození biomakromolekul [44].

2.4.3 Molekulární interakce polyfenolů

2.4.3.1 Interakce s enzymy

Fenolové látky interagují s proteiny hydrofobním benzenovým jádrem nebo hydrofilními hydroxylovými skupinami. Za určitých podmínek se chovají jako inhibitory enzymů. Tato interakce bývá často nespecifická, např. u taninů a dalších polyhydroxylovaných fenolových látek. Specifické reakce probíhají při přímé interakci polyfenolů s aktivním místem enzymu [45].

Polyfenoly [46] a jejich oxidační produkty [47] inhibují aktivitu xantinoxidasy, enzymu katalyzující přeměnu xantinu na kyselinu močovou, při kterém vzniká superoxidový radikál. Na druhé straně působením peroxidas (např. myeloperoxidasa v neutrofilech) vznikají fenoxylové radikály, které mohou indukovat peroxidaci lipidů nebo oxidaci glutathionu [7]. Bylo zjištěno, že flavonoidy inhibují expresi indukibilní NO-syntasy, cyklooxygenasy-2 a 5-lipoxygenasy [48, 49], které jsou zodpovědné za produkci oxidu dusnatého, uvolnění kyseliny arachidonové, prostanoidů, leukotrienů a dalších mediátorů zánětu, jako jsou cytokiny a chemokiny. Flavonoidy mohou inhibovat jak cytosolické, tak membránové tyrosinkinasy, které mají různé funkce jako je enzymová aktivita, transport přes membránu, jsou zapojeny do signálních drah, řízení buněčného cyklu a diferenciaci buněk. Inhibice tyrosinkinasy tedy vede k regulaci nekontrolovatelné proliferaci [50, 51]. Polyfenolové sloučeniny mají také schopnost indukovat apoptózu u maligních buněk. Místa jejich účinku jsou různá, mohou např. aktivovat kaspasy 3 a 9, snižovat expresi genu *Bcl-2* a zvyšovat expresi genů *Bax* a *Bak* [52]. Kromě těchto účinků, mají polyfenoly i další významné

inhibiční účinky, např. polyfenoly bobulovitých plodů ovlivňují klíčové enzymy jako je lipasa, α -amylasa a α -glukosidasa podléající se na trávení lipidů a sacharidů [45].

2.4.3.2 Interakce s buněčnými receptory

Podobně jak fenolové sloučeniny interagují s enzymy, mohou interagovat s buněčnými receptory, což vede k jejím funkčním změnám. Fenolové látky (isoflavony, kumestany a lignany) a jejich metabolity mají schopnost se vázat na estrogenový receptor [53]. U mladých jedinců mohou tyto fytoestrogeny působit negativně na vývoj. U dospělých jedinců je však stále více zřejmé, že fytoestrogeny mohou působit profylakčně proti nádorům, např. rakovině prsu [54].

Nejpravděpodobnější se jeví hypotéza podle Bowersona, která tvrdí, že *trans*-resveratrol ve většině případů působí agonisticky na β -estrogenový receptor a antagonisticky na α -estrogenový receptor. Jak již bylo popsáno výše, flavonolignan silybin B interaguje s estrogenovým receptorem na rozdíl od jeho izomeru A [10]. Při interakci resveratrolu s estrogenovými receptory buněčných linií karcinomu prsu dochází k modulaci tumorsupresorových genů např. *BRCA1*. Fenolové látky izolované z *Dalbergia cochinchinensis* mohou navíc působit také jako antiandrogeny [55]. Kromě interakce polyfenolů s estrogenovými receptory, některé flavonoidy interagují s adenosinovými [56] nebo benzodiazepinovými receptory [57]. Lignany působí jako antagonisté faktoru aktivující destičky (PAF) [58], isoflavonoidy (genistein), flavonoidy (naringenin a kaempferol) interagují s buněčnými transportéry jako je P-glykoprotein, základní bílkovina lékové rezistence (multidrug resistance-associated protein) [59].

2.4.3.3 Interakce s lipidy

Interakce polyfenolů s lipidovou membránou mohou zprostředkovat jejich biologickou aktivitu. Rozpustnost polyfenolů v lipidech je také kritickým faktorem jejich biologické dostupnosti a v neposlední řadě hrají důležitou roli v ochraně buněk před peroxidací lipidů. Mechanismus, kterým polyfenoly překonávají hydrofobní bariéru buněčných membrán, ještě není zcela objasněn. Je známo, že aglykony jsou ve vodě jen omezeně rozpustné a mohou spontánně přecházet přes fosfolipidovou dvojvrstvu membrány [60].

Absorpci a biologické dostupnosti je věnován značný zájem [61-63]. Na buněčné linii Caco-2 byl zkoumán buněčný příjem a transport např. kvercetinu [62], isoflavonů [64] a katechinů [65]. Protektivní účinky flavonoidů kvercetinu, myricetinu, luteolinu a (-)epigallokatechin gallátu byly testovány na střevní buněčné linii Caco-2, kdy produkt

peroxidace lipidů, malondialdehyd, byl sledován po inkubaci v přítomnosti H_2O_2 a FeSO_4 [66]. Aglykony se jeví účinnějšími inhibitory peroxidace lipidů než jejich odpovídající glykosidy [67]. Bylo prokázáno, že flavonoidy (fisetin, kvercetin, chrystin, morin) jsou schopny chránit lipidy buněčné membrány červených krvinek proti peroxidaci [68].

2.4.3.4 Interakce s DNA

Jak bylo popsáno výše, polyfenoly jsou přirozeně se vyskytující antioxidanty, které za určitých podmínek disponují prooxidačními vlastnostmi vedoucí k degradaci DNA v přítomnosti/nepřítomnosti kovových iontů [33, 69]. Bylo prokázáno, že polyfenoly spolu s ionty přechodných kovů a DNA tvoří ternární komplexy. Kometovou analýzou byl studován prooxidační efekt komplexů polyfenol-Cu na izolovaných lidských lymfocytech. Degradace lymfocytární DNA byla zastavena neokuproininem, specifickým činidlem vázajícím Cu^+ ionty [33]. Protektivní účinky flavonoidů myricetinu, kvercetinu a rutinu vůči DNA byly studovány na buněčných kulturách Caco-2 a HepG2 po expozici H_2O_2 [70]. Polyfenoly inhibují savčí topoisomerasy I a II, enzymy chránící strukturu DNA během replikace, transkripce a rekombinace [71-74] a DNA methyltransferasy *in vitro* [75].

2.4.4 *In vivo* studie

2.4.4.1 Biologická dostupnost a metabolismus polyfenolů

In vivo účinky polyfenolů jsou závislé na jejich přeměnách v trávicím traktu. Absorpce a metabolismus fenolových látek jsou určeny jejich chemickou strukturou, závislou na stupni glykosylace/acylace, skeletu, konjugací s jinými fenolovými látkami, velikostí molekuly, stupni polymerace a rozpustností [1]. Biologická dostupnost je velmi nízká. Obvykle méně než 1% konzumovaných flavonoidů vstupuje do krevního řečiště [76].

Polyfenoly jsou absorbovány v tenkém a tlustém střevě, kde zpravidla podléhají chemickým přeměnám vlivem střevní mikroflóry. Minimální absorpce přírodních fenolových látek v dutině ústní byla prokázána u stilbenů [77, 78]. Slinné enzymy se mohou také podílet na hydrolýze glykosidických polyfenolů. Mezi střevní enzymy účastníci se deglykosylace polyfenolů patří především laktasa (LPH) a cytosolická β -glukosidasa. K neenzymatickému rozkladu glykosidů žaludečními šťávami nebo průchodu volných glykosidů přes střevní kartáčový lem dochází jen velmi omezeně. Z *in vivo* studií vyplývá, že flavonoidy jsou relativně stabilní v gastrickém prostředí [79]. Fenolové látky, které nebyly absorbovány v tenkém střevě, jsou dále metabolizovány bakteriemi v tlustém střevě, kde kromě deglykosylace dochází k rozkladu polyfenolů na jednotlivé strukturní jednotky. Po absorpci

jsou fenolové látky enzymaticky metabolizovány v jednotlivých tkáních. Kromě částečné tvorby konjugátů s kyselinou glukuronovou ve střevní sliznici, probíhají konjugační reakce (glukuronidace, sulfatace a methylace) v játrech [80].

2.4.4.2 Biologická aktivita na experimentálních zvířatech

Studie na zvířatech a lidech jsou zaměřeny především na monitorování biomarkerů oxidačního poškození v plazmě (F₂-isoprostany) a moči (8-hydroxy-2'-deoxyguanosin), celkové sérové antioxidační kapacity, stanovení aktivity antioxidačních enzymů. Výsledky studií jsou nejednoznačné [24].

Hepatoprotektivní účinky flavonoidů byly studovány u potkanů a myší po podání hepatotoxinu tetrachlormethanu indukujícím oxidativní stres a s ním spojené oxidativní poškození biomakromolekul a buněčnou smrt. Bylo zjištěno, že polyfenoly jsou schopny chránit jaterní buňky před oxidativním poškozením a udržet hladinu intracelulárních enzymů jako je alaninaminotransferasa a aspartátaminotransferasa [81, 82]. Hepatoprotektivní účinky byly dále zkoumány např. u potkanů s nealkoholickou steatohepatitidou po podání extraktu silymarinu [83]. Při intraperitoneálním podávání rutinu a kvercetin (80 mg/kg) potkanům došlo ke snížení akutní i chronické formy zánětu [84]. Protizánětlivé účinky kvercitrinu byly pozorovány na potkaním modelu se střevním zánětem [85]. Kvercetin a apigenin inhibují růst melanomu a ovlivňují metastáze u myší [20]. Flavonoidy kvercetin, kaempferol a myricetin byly popsány jako účinné inhibitory agregace krevních destiček u psů a opic [86]. Neuroprotektivní účinky kurkuminu byly popsány na základě jeho schopnosti inhibovat neurotoxicitu homocysteinu a s ním spojenou peroxidaci lipidů u potkanů [87].

2.4.4.3 Biologická aktivita na lidech

Řada studií ukázala inverzní vztah mezi rizikem vzniku koronárních onemocnění a konzumací stravy bohaté na polyfenoly. Intervenční studie ukázala [88], že polyfenoly jsou schopny inhibovat oxidaci LDL a agregaci krevních destiček, což se považuje za klíčový mechanismus v rozvoji aterosklerózy. Mezi protektivní účinky polyfenolů v případě kardiovaskulárních onemocnění řadíme antioxidační, antiagregační a protizánětlivé efekty, dále schopnost zvyšovat hladinu HDL a podporovat endoteliální funkci [89]. Schopnost polyfenolů ovlivňovat krevní tlak u žen ($n = 218$) ve věku nad 70 let byla ukázána ve studii [89]. Intervenční studie po týdenní konzumaci (165 g/den) čerstvých bobulí zimolezu modrého ukázala signifikantně zvýšenou hladinu fenolových kyselin v moči a markerů oxidativního stresu glutathionperoxidasy, katalasy [90]. Po šestiměsíčním podávání silymarinu

v kombinaci se selenem došlo k signifikantnímu snížení dvou parametrů metabolismu lipidů (LDL, celkového cholesterolu), které mají vztah k rakovině prostaty u mužů po radikální prostatektomii [91].

Absorpce, metabolismus a eliminace jednotlivých polyfenolů se značně liší. V převážné většině klinických studií se k testování využívají nápoje nebo potraviny obsahující směs polyfenolů. Všechny tyto aspekty by měly přijít v úvahu při navrhování experimentu i při interpretaci pozorovaných účinků.

2.5 Experimentální metody ve výzkumu polyfenolů

Pro studium interakcí polyfenolů s biomakromolekulami (proteiny, DNA a lipidy) se využívá široké spektrum analytických metod, např. interakce polyfenolů s albuminem byla zkoumána gelovou permeační chromatografií [92], metodou cirkulárního dichroismu [93], fluorescenční spektroskopií [94-96], infračervenou spektroskopií s Fourierovou transformací [97], SDS-polyakrylamidovou gelovou elektroforézou [98]. Interakci polyfenolů s DNA lze sledovat EPR spektroskopií [99], hmotnostní spektrometrií [100], spektrofotometricky [101], fluorescenční spektroskopií [102] a kometovou analýzou [103]. Pro studium interakce lipidů s polyfenoly byly použity metody fluorescenční spektroskopie [104, 105], EPR [106] a infračervená spektroskopie [107]. Pro identifikaci metabolitů flavonoidů se nejčastěji používá vysokoúčinná kapalinová chromatografie [108-110] nebo plynová chromatografie [109, 111, 112] ve spojení s hmotnostní spektrometrií [90, 108-110].

Elektrochemické metody jsou používány pro studium interakcí polyfenolů s proteiny a DNA, ale také pro studium jejich reaktivity, a to z hlediska jejich antioxidačních a prooxidačních vlastností, stability, oxidačních mechanismů nebo kinetických parametrů biochemických reakcí. Elektrochemické metody použité pro analýzu flavonoidů při pH 7 jsou shrnuty v tabulce 2. Výhodou elektrochemických metod je minimální spotřeba vzorků (při využití adsorpční přenosové techniky), relativně nízké náklady a jedná se o poměrně rychlé a citlivé metody.

PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

Tabulka 2. Elektrochemické stanovení flavonoidů ve vodném prostředí pufrů pH 7 (GCE: elektroda ze skelného uhlíku, CPE: uhlíková pastová elektroda, Pencil GE: pentilková grafitová elektroda, PGE: uhlíková elektroda z pyrolytického grafitu; CV: cyklická voltametrie, SWV: voltametrie s vkládaným pravoúhlým napětím, DPV: diferenční pulzní voltametrie).

flavonoid	elektrolyt	elektroda	metoda	zdroj
(-)epigalokatechin	fosfátový pufr	GCE	CV	[113]
		CPE	DPV	[114]
		modifikovaná CPE		
(-)epigalokatechin gallát	fosfátový pufr Britton-Robinsonův pufr	GCE	CV	[113] [115]
		CPE	DPV	[116]
		modifikovaná CPE		
(-)epikatechin	fosfátový pufr, Britton-Robinsonův pufr	GCE	CV	[113, 115, 117, 118]
(-)epikatechin gallát	fosfátový pufr	GCE	CV	[113]
fisetin	acetátový pufr	GCE	CV	[119]
(+)galokatechin	fosfátový pufr	pencil GE	DPV	[120]
(+)galokatechin gallát	fosfátový pufr	pencil GE	DPV	[120]
isorhamnetin	Britton-Robinsonův pufr	GCE	CV	[115, 117]
isosilybin	fosfátový pufr	PGE	SWV	[121]
kaempferol	Britton-Robinsonův pufr fosfátový pufr	GCE	CV	[115, 117]
		modifikovaná CE		[122, 123]
katechin	fosfátový pufr Britton-Robinsonův pufr	GCE	CV	[113, 115, 117, 124-130]
			DPV	[126, 131]
			SWV	[126, 128, 129]
		modifikovaná GCE	CV	[125, 127, 130]
		pencil GE	DPV	[120]
			CV	
CPE	DPV	[114, 116]		
modifikovaná CPE				
katechin gallát	fosfátový pufr	pencil GE	CV	[120]
			DPV	
kvercetin	fosfátový pufr, Britton-Robinsonův pufr, acetátový pufr	GCE	CV	[115, 117, 124, 126-128, 132-142]
		modifikovaná GCE		[127, 132, 135, 138, 143]
		GCE	SWV	[126, 128, 139, 144]
		modifikovaná GCE		[145]
		GCE	DPV	[126, 139, 146]
		CPE	DPV	[116]

PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

kvercetin	fosfátový pufr, Britton-Robinsonův pufr, acetátový pufr	modifikovaná CPE	DPV CV	[116, 147] [142]
		modifikovaná CE	CV	[122, 123]
		pencil GE	CV DPV	[120]
3- <i>O</i> -galloylkvercetin	fosfátový pufr	GCE	CV SWV DPV	[146]
morin	fosfátový pufr	GCE	CV	[148]
		CPE		[149]
		modifikovaná CPE		[149]
		modifikovaná CE		[122]
myricetin	fosfátový pufr Britton-Robinsonův pufr	pencil GE	CV DPV	[120]
		GCE	CV	[115, 117]
		modifikovaná CE		[122]
robinin	fosfátový pufr	GCE	CV DPV	[150]
rutin	fosfátový pufr Britton-Robinsonův pufr	GCE	CV	[124] [115, 126-128, 135, 140, 142]
		modifikovaná GCE		[127, 135, 143]
		GCE	SWV	[126, 128, 144]
		modifikovaná GCE		[145]
		GCE	DPV	[126, 131]
		CPE	DPV	[116]
		modifikovaná CPE	DPV CV	[116, 142] [142]
		silybin	fosfátový pufr, Britton-Robinsonův pufr	GCE
DPV	[146]			
PGE	CV			[146, 152]
	SWV			[152, 153]
silybin galaktosid	fosfátový pufr	GCE	CV	[151]
silybin glukosid				
silybin laktosid				
silybin maltosid				
3- <i>O</i> -galloylsilybin	fosfátový pufr	GCE	CV SWV DPV	[146]
2,3-dehydrosilybin	fosfátový pufr	PGE	CV	[121]
		GCE		[134]
taxifolin	fosfátový pufr,	GCE	CV	[115, 117, 133-135]

PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

	Britton-Robinsonův pufr	modifikovaná GCE		[135]
--	-------------------------	---------------------	--	-------

3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Cílem disertační práce bylo doplnit poznatky v oblasti antiradikálových resp. antioxidačních a prooxidačních vlastností flavonolignanů a jejich konjugátů s kyselinou gallovou a dále studovat biotransformaci dvou nově připravených derivátů kvercetinů a taxifolinu na izolovaných lidských hepatocytech.

Konkrétní cíle:

1. *Ex situ* a *in situ* elektrochemická analýza flavonolignanů pomocí uhlíkových elektrod:
 - a) oxidace a adsorpčně/desorpční chování flavonolignanů,
 - b) antioxidační a chelatační vlastnosti flavonolignanů,
 - c) interakce flavonolignanů s DNA a proteiny,
 - d) vliv substituce gallátem na oxidaci silybinu a kvercetinů, antioxidační a prooxidační vlastnosti.

2. Elektrochemická analýza interakcí flavonolignanů silymarinového komplexu s membránami erytrocytů a HPLC-MS analýza metabolitů 3-*O*-galloylkvercetinů a 7-*O*-galloyltaxifolinu:
 - a) interakce flavonolignanů silymarinového komplexu s membránami erytrocytů,
 - b) metabolická studie 3-*O*-galloylkvercetinů a 7-*O*-galloyltaxifolinu na lidských hepatocytech.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál a chemikálie

4.1.1 Buněčné modely

Lidské hepatocyty byly izolovány z jater multiorgánových dárců Fakultní nemocnice Olomouc [154, 155]. Veškerá práce byla prováděna s povolením Etické komise FNOL a LF UP v Olomouci a v souladu s českou legislativou. Myší fibroblasty Balb/c 3T3 (klon A31) byly zakoupeny (The European Collection of Cell Cultures, Velká Británie). Erytrocyty byly získány od zdravých dobrovolníků dle metodiky [156].

4.1.2 Chemikálie

Flavonoidy: silybin (směs diastereomerů A a B v přibližném poměru 1:1) a silymarin byly poskytnuty Dr. Cvakem z firmy TEVA, Divize TAPI (Opava, Česká republika), taxifolin (AMARGO, CZ), 2,3-dehydrosilybin, 20-*O*-methylysilybin, 7-*O*-methylysilybin, 3-*O*-galloylquercetin, 7-*O*-galloyltaxifolin, 7-*O*-galloylsilybin, 3-*O*-galloylsilybin byly získány od prof. Křena z Mikrobiologického ústavu AVČR. Quercetin, kyselina gallová a methylester kyseliny gallové byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich (USA).

Dvouválcová DNA z telecího brzlíku a jednoválcová DNA byly zakoupeny od Sigma-Aldrich (USA), oligonukleotidy (CCGCGCGCCACGCTGGGGGACCTCGGGGCC) od firmy VBC Biotech (Rakousko).

L-arginin, disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA), 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl (DPPH), dimethylsulfoxid (DMSO), dodecylsulfát sodný (SDS), N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina (HEPES), telecí sérový albumin (BSA), dihydrogenfosforečnan draselný (KH₂PO₄), hydrogenfosforečnan draselný (K₂HPO₄), hydroxid sodný (NaOH), chlorid draselný (KCl), hexahydrát chloridu hořečnatého (MgCl₂ x 6H₂O), dihydrát chloridu měďnatého (CuCl₂ x 2H₂O), hexahydrát chloridu nikelnatého (NiCl₂ x 6H₂O), chlorid sodný (NaCl), hexahydrát chloridu železitého (FeCl₃ x 6H₂O), křenová peroxidasa (HRP), kyselina boritá (H₃BO₃), kyselina chlorovodíková (HCl), kyselina fosforečná (H₃PO₄), kyselina octová (CH₃COOH), 5-difenyltetrazolium bromid (MTT), luminol, methanol (MeOH), octan sodný (CH₃COONa), peroxid vodíku (H₂O₂), stabilizovaný roztok penicilinu (10 000 U.ml⁻¹) se streptomycinem (10 mg.ml⁻¹; PenStrep), D-sorbitol, streptomycin sulfát, N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED), tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), Triton X-100, (±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina (trolox), roztok trypanové modři (0,4%), Tween 20, Williamsovo médium E (WME) byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (USA). Eagleovo médium modifikované Dulbeccoem (DMEM) a médium DMEM/F-12 (Ham) bylo koupeno od firmy GIBCO – Life Technologies (USA). Fetální hovězí sérum (FBS) od firmy Biochrom (Německo) a fetální telecí sérum (FCS) od firmy Invitrogen. Roztok akrylamidu s N,N'-methylenbisakrylamidem (29:1, 40%) od firmy Merck (Německo), paramagnetické mikročástice Dyna beads Oligo (dT)₂₅ byly dodány firmou Dynal A.S. (Norsko), standard molekulové hmotnosti a DNA vzorkový pufr byly zakoupeny od firmy Thermo Fisher Scientific Inc. (USA). Diamantový sprej (velikost částic 3 μm) (Kernet Int., Velká Británie).

4.1.3 Roztoky

Pufry pro elektrochemickou analýzu

univerzální tlumivý roztok (Britton-Robinson): směs kyselin obsahující 0,04 mol.l⁻¹ CH₃COOH, 0,04 mol.l⁻¹ H₃PO₄, 0,04 mol.l⁻¹ H₃BO₃ (2,74 ml 85% H₃PO₄, 2,29 ml 99,8% CH₃COOH a 2,474 g H₃BO₃ v 1 litru vody) se smísil s 0,2 mol.l⁻¹ NaOH,

acetátový pufr: (0,2 mol.l⁻¹ CH₃COOH + 0,2 mol.l⁻¹ CH₃COONa),

fosfátový pufr: (0,1 mol.l⁻¹ KH₂PO₄ + 0,1 mol.l⁻¹ K₂HPO₄).

Roztoky pro gelovou elektroforézu oligonukleotidů

10x TBE pufr (pH 8,3): 27 g TRIS, 13,75 g H₃BO₃, 2,33 g disodná sůl kyseliny ethylen-1,2-diamintetraethanové, doplněné do 250 ml deionizovanou vodou,

migrační pufr: 10x TBE pufr naředěný na 1x TBE pufr,

migrační gel: 15% polyakrylamidový gel: 40% roztok akrylamidu/bisakrylamidu 29:1 (4 ml), deionizovaná voda (3,7 ml), 10x TBE (pH 8,3) (2,6 ml), 10% amonium persulfát (100 μl), 0,1% tetramethylethylendiamin (10 μl),

zaostřovací gel: 10% polyakrylamidový gel: 40% roztok akrylamidu/bisakrylamidu 29:1 (0,4 ml), deionizovaná voda (2,56 ml), 10x TBE (pH 8,3) (1 ml), 10% amonium persulfát (20 μl), 0,1% tetramethylethylendiamin (4 μl),

barvicí roztok: 10 mg methylenová modř, 500 μl 10x TBE, 49,5 ml deionizovaná voda.

Hanksův solný roztok (HBSS) pro izolaci erytrocytů

0,4 g KCl, 0,06 g KH₂PO₄, 0,2 g MgSO₄ x 7H₂O, 8,0 g NaCl, 0,35 g NaHCO₃, 0,12 g Na₂HPO₄ x 12H₂O, 1,0 g glukosy a 0,14 g CaCl₂ rozpuštěno v 1 litru deionizované H₂O; pH upraveno pomocí HCl nebo NaOH na pH 7,4.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Roztoky pro izolaci a kultivaci buněk

Lidské hepatocyty:

Premix: glukosa (7 mmol.l^{-1}), glutamin (2.4 mmol.l^{-1}), penicilin G ($0,016 \text{ mmol.l}^{-1}$), streptomycin sulfát ($9,6 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$), pyruvát sodný ($0,4 \text{ mmol.l}^{-1}$), dexamethason ($1,78 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$), holo-transferin (5 mg.l^{-1}), ethanolamin ($1 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$), inzulin (350 nmol.l^{-1}), glukagon ($0,2 \text{ mg.l}^{-1}$), linolová kyselina ($11 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$).

Promývací roztoky a média:

HEPES 1: HEPES (20 mmol.l^{-1}), NaCl (120 mmol.l^{-1}), glukosa ($0,5\%$), KCl (5 mmol.l^{-1}), amfotericin B ($4,1 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$), PenStrep (1%), manitol ($0,1 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$), sorbitol ($0,1 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$), glutathion redukovaný ($0,1 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$), pH 7,4,

HEPES 2: HEPES (20 mmol.l^{-1}), NaCl (120 mmol.l^{-1}), glukosa ($0,5\%$), KCl (5 mmol.l^{-1}), amfotericin B ($4,1 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$), PenStrep (1%),

HEPES 3: HEPES (20 mmol.l^{-1}), NaCl ($0,12 \text{ mol.l}^{-1}$), glukosa ($0,5\%$), KCl (5 mmol.l^{-1}), amfotericin B ($4,1 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$), PenStrep (1%), CaCl_2 ($7 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$), kolagenasa typ IV (600 mg.l^{-1}),

HEPES 4: HEPES (20 mmol.l^{-1}), NaCl (120 mmol.l^{-1}), glukosa ($0,5\%$), KCl (5 mmol.l^{-1}), amfotericin B ($4,1 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$), PenStrep (1%), bovinní sérum (5%, v/v),

EGTA: KCl ($5,4 \text{ mmol.l}^{-1}$), KH_2PO_4 ($0,44 \text{ mmol.l}^{-1}$), NaCl (140 mmol.l^{-1}), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ ($0,34 \text{ mmol.l}^{-1}$), EGTA ($0,5 \text{ mmol.l}^{-1}$), Tricin (25 mmol.l^{-1}), amfotericin B ($4,1 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$), PenStrep (1%), pH 7,2.

Kultivační médium ISOM: Williamsovo médium E (WME) (0,5 l), DMEM/F12 (Ham) médium (0,5 l), pH 7,2, askorbová kyselina (15 mg), premix (37 ml), fetální bovinní sérum (5%, v/v).

Bezserové médium ISOM: WME (0,5 l), DMEM/F12 (Ham) médium (0,5 l), pH 7,2, askorbová kyselina (15 mg), premix (37 ml).

Balb/c 3T3

Kultivační médium: Eagleovo médium modifikované Dulbeccoem (DMEM), penicilin G ($0,063 \text{ mg.l}^{-1}$), streptomycin ($100 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$), novorozenecké telecí sérum (5%, v/v), fetální bovinní sérum (5%, v/v).

Bezserové médium: Eagleovo médium modifikované Dulbeccoem (DMEM), penicilin G ($0,063 \text{ mg.l}^{-1}$), streptomycin ($100 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$), novorozenecké telecí sérum (5%, v/v).

4.1.4 Přístroje

Analytické váhy AX 105 Delta-Range, Mettler-Toledo (Greifensee, Švýcarsko),

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Centrifuga Eppendorf miniSpin (Eppendorf, Německo),
Centrifuga chlazená Z 323 K (Hermle, dodává Biotech, Česká republika),
Centrifuga chlazená Mikro 22 a Rotina 38R (Hettich, dodává Biotech, Česká republika),
Centrifuga Labofuge 400 (Heraeus, Německo),
Fotometr pro měření absorbance v 96-jamkových deskách Infinite M200 (Tecan, Švýcarsko),
Hlubokomrazící box Jouan VX 380 (Jouan, Francie),
Homogenizátor Ultra-Turax T 25 basic (Ika Werte, Německo),
Luminiscenční spektrometr Luminoskan Ascent (Thermolabsystems, USA),
Inkubátor Cellstar (Queue System, USA),
Inkubátor Enviromental Shaker (Biosan, Lotyšsko),
Laminární box CLF (Schoeller Instruments, Česká republika),
Magnetická míchačka IKA RH basic KT/C (Slabo, Česká republika),
Magnetický stojánek Invitrogen (Oslo, Norsko),
Mikroskop CK40 a BX40 (Olympus, Japonsko),
pH metr inoLab Level 1 (SchoellerInstruments, Česká republika) se skleněnou kombinovanou elektrodou SenTix41 (WTW, Německo) a Crison micro pH 2001 (Rainin Instrument Co. Inc, USA) se skleněnou kombinovanou elektrodou (Ingold),
Rotační zařízení Büchi Waterbath B-480 s Büchi Rotavapor R-114
Systém pro elektroforézu Mini-Protean[®] 3 Cell se zdrojem PowerPac 200 nebo PowerPac 3000 (Bio-Rad Laboratories, Německo),
Systém pro elektrochemickou analýzu μ Autolab III analyzátor (EcoChemie, NL) v tříelektrodovém uspořádání (pomocná platinová elektroda, referenční Ag/AgCl/3M KCl a pracovní uhlíková elektroda z pyrolytického grafitu) a Ivium potenciostat vybavený softwarem IviumSoft verze 1.9 (Ivium Technologies, Nizozemsko) v tříelektrodovém uspořádání (pomocná platinová elektroda, referenční Ag/AgCl/3M KCl a pracovní elektroda ze skelného uhlíku (Bio-Logic SAS, Francie),
Systém pro vysokoúčinnou chromatografii HPLC (Acquity UPLC systém, Waters, USA) s kolonou (Agilent Phenyl Zorbax Eclipse XDB: 150 mm x 2,1 mm, i.d. 5 μ m) (Agilent Technologies, USA), hmotnostním detektorem kvadrupól/analyzátor doby letu (QqTOF Premier Mass Spectrometer (Waters, Velká Británie) spojené elektrosprejem ionizačního zdroje (ESI),
Termomixer Comfort (Eppendorf, Německo),
Třepačka OLS 200 (Grant Instruments, Velká Británie),
Třepačka Duomax 1030 (Heidolph, Německo),

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Třepačka Reax top (Heidolph, Německo),

UV-VIS spektrofotometr Specord 250 Plus (Analytik Jenam, Německo),

Ultrazvuková termostatová vodní lázeň PS 01000A (Notus-Powersonic, Slovensko),

Zařízení pro přípravu deionizované vody Ultrapur (Watrex, Česká republika).

4.2 Statistická analýza

Všechny experimenty byly provedeny v tripletech ve třech nezávislých opakováních. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD. Statistické vyhodnocení *in vitro* získaných dat bylo provedeno pomocí programu MS Excel 2010 (Microsoft, USA) Studentovým t-testem. Statistické vyhodnocení antioxidačních účinků pomocí DPPH testu a prooxidačních účinků pomocí elektroforézy bylo provedeno jednofaktorovou analýzou rozptylu (ANOVA) s hladinou významnosti 0,01.

4.3 *Ex situ* a *in situ* elektrochemická analýza flavonolignanů pomocí uhlíkových elektrod

Elektrochemická analýza byla provedena vždy za přítomnosti kyslíku.

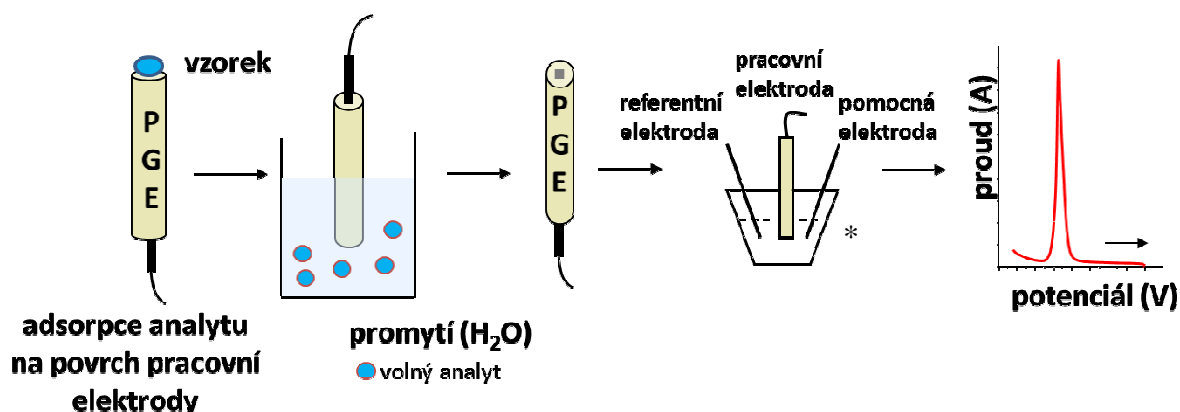
4.3.1 Příprava zásobních roztoků flavonoidů

Zásobní roztoky flavonoidů v koncentraci 1 mg.ml^{-1} byly připraveny v methanolu. Z methanolickeých roztoků byly flavonoidy následně ředěny do požadovaného pufru (elektrolytu).

4.3.2 Elektrochemické metody

4.3.2.1 *Ex situ* voltametrie (adsorpční přenosová (AdT) technika)

Na povrch pracovní elektrody bylo aplikováno $5 \mu\text{l}$ vzorku, který byl adsorbován po dobu 60 s (pokud není uvedeno jinak). Poté byla elektroda opláchnuta v deionizované H_2O a ponořena do elektrochemické cely obsahující základní elektrolyt (obr. 7).



Obrázek 7. Schéma *ex situ* voltametrie. Měření *in situ* probíhá přímo v elektrochemické cele*, kde je analyt rozpuštěn v základním elektrolytu. PGE: pyrolytická grafitová elektroda.

4.3.2.2 *In situ* voltametrie

Vzorek flavonoidu byl přidán přímo do základního elektrolytu v elektrochemické cele. Po ponoření elektrody do zkoumaného roztoku byla provedena elektrochemická analýza.

4.3.2.3 Cyklická voltametrie (CV)

Parametry metody: rychlost skenu $50-1000 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

4.3.2.4 Diferenční pulzní voltametrie

Parametry metody: pulsní amplituda 50 mV, doba pulsu 70 ms, rychlost skenu $5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

4.3.2.5 Voltametrie s vkládaným pravouhlejším napětím

Parametry metody: frekvence $f = 50-200 \text{ Hz}$, pulsní amplituda 50 mV.

4.3.3 Příprava roztoků dvouvláknové DNA, jednovláknové DNA, oligonukleotidů a stanovení koncentrace

Princip: Nukleové kyseliny absorbují ultrafialové světlo při vlnové délce 260 nm [157].

Postup: Dvouvláknová DNA (dsDNA), jednovláknová DNA (ssDNA) a oligonukleotidy byly rozpuštěny v deionizované H_2O a následně byla spektroskopicky

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

změřena absorbance. Roztok DNA se spektrofotometricky vyhodnocuje při vlnové délce 260 nm a 280 nm. Absorbance při 260 nm odráží koncentraci DNA, poměr absorbance 260 nm/280 nm souvisí s čistotou DNA, tj. míru přítomnosti proteinů.

Pro výpočet koncentrace se vychází z následujících vztahů [157]:

Při vlnové délce 260 nm je absorbance roztoku rovna 1, pokud je v měřeném roztoku:

- dsDNA o koncentraci $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

- ssDNA o koncentraci $37 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

V experimentech využívajících magnetické částice, byla dsDNA připravena hybridizací dvou vláken, vlákno I: 5'-CCG CGC GCC ACG CTG GGG GAC CTC GGG GCC a vlákno II: 5'-GGC CCC GAG GTC CCC CAG CGT GGC GCG CGG, které na svém konci navíc obsahovalo sekvenci 25 adeninů (A_{25}). DNA duplex byl připraven smícháním vláken v molárním poměru 1:1 v $0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl, zahříván 3 min při teplotě 85°C a poté pomalu ochlazen.

4.3.4 Stanovení antioxidační aktivity

4.3.4.1 Stanovení zhášení DPPH radikálu

Princip metody: Antiradikálová aktivita byla testována metodou zhášení radikálu DPPH (1,1-difenyl-2-pikrylhydrazylu) [158].

Postup: Do jamek mikrotitrační destičky bylo napipetováno $90 \mu\text{l}$ methanolového roztoku testovaného vzorku v koncentracích 0, 25 a $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ následně bylo přidáno $180 \mu\text{l}$ methanolového roztoku DPPH ($20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a po 30 min byla změřena absorbance při 517 nm.

4.3.4.2 Chemiluminiscence

Princip: Celková antioxidační kapacita byla měřena chemiluminiscencí na přístroji Luminoskan Ascent podle protokolu [159]. Výsledek byl vyjádřen jako čas v sekundách, po který studované látky byly schopny inhibovat světelnou emisi.

Postup: $20 \mu\text{l}$ studované látky bylo smícháno s $20 \mu\text{l}$ křenové peroxidasy o koncentraci $0,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ v mikrotitrační destičce. Po přidavku $160 \mu\text{l}$ chemiluminiscenční směsi obsahující $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ H_2O_2 a $0,04 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ luminolu ve fosfátovém pufru (pH 7,4) byla zahájena chemiluminiscenční reakce.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.3.5 Stanovení prooxidačních vlastností

4.3.5.1 Tvorba komplexů flavonolignan/kov

Komplexy flavonolignanů s ionty kovů byly připraveny smícháním flavonolignanu o koncentraci $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$ s ionty kovů o koncentraci $0\text{-}20 \mu\text{mol.l}^{-1}$ v $0,2 \text{ mol.l}^{-1}$ NaCl (pH 6,5) a inkubovány 15 min při laboratorní teplotě.

4.3.5.2 UV/VIS spektra komplexů flavonolignan/kov

Stechiometrický poměr komplexu flavonolignan/kov byl určen UV/VIS absorpční spektroskopií. UV/VIS absorpční spektra byla pořízena na spektrometru Specord 250 Plus při rychlosti skenu 5 nm.s^{-1} a šířce štěrbinu 1 nm. Měření bylo provedeno v křemenných kyvetách.

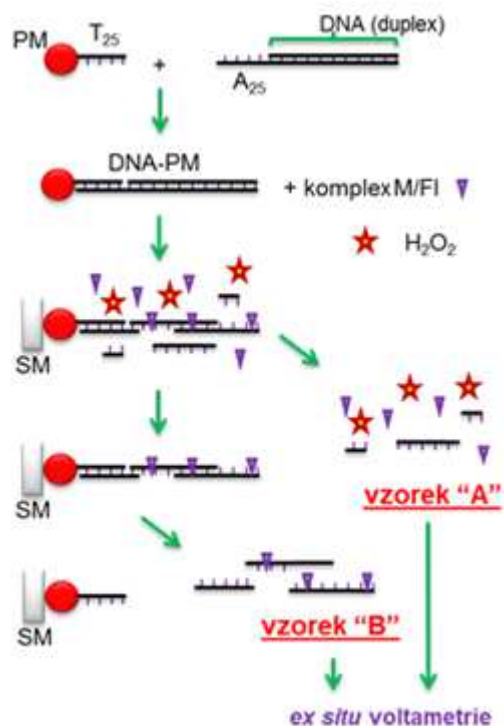
4.3.5.3 Interakce s DNA

Flavonolignany nebo jejich komplexy s ionty přechodných kovů (za přítomnosti H_2O_2) byly inkubovány s dsDNA, resp. ssDNA, ve fosfátovém pufru (pH 7,4) po dobu 15 min při 37°C a poté byly elektrochemicky analyzovány.

4.3.5.4 Dvoupovrchová technika: použití paramagnetických částic

$10 \mu\text{l}$ paramagnetických mikročástic, na jejichž povrchu byla navázána sekvence T_{25} , bylo inkubováno s připraveným DNA duplexem obsahující sekvenci A_{25} v prostředí Tris/HCl obsahujícím $0,2 \text{ mmol.l}^{-1}$ NaCl (pH 7,4) (pufr A) při 20°C po dobu 30 min. Následně byly paramagnetické mikročástice s navázanou DNA promyty 4 x pufr A, inkubovány s komplexem flavonolignan/kov o koncentraci $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a 2% H_2O_2 při 37°C po dobu 15 min. Pomocí magnetického stojánu byly odděleny volné fragmenty DNA. Dále byly paramagnetické mikročástice s DNA promyty 3 x $0,5 \text{ ml}$ NaCl o koncentraci $0,2 \text{ mol.l}^{-1}$ a zahřáty na 85°C po dobu 3 min. Produkty oxidativního poškození DNA byly uvolněny do $50 \mu\text{l}$ deionizované H_2O a po přidavku $5 \mu\text{l}$ NaCl o koncentraci 2 mol.l^{-1} rychle ochlazeny na ledu (obr. 8).

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST



Obrázek 8. Aplikace paramagnetických mikročástic pro izolaci oxidačních produktů a fragmentů DNA (PM: paramagnetické částice, SM: magnetický stojánek, Fl: flavonolignan, M: kov)

4.3.5.5 Gelová elektroforéza oligonukleotidů

Připravené vzorky obsahující $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ DNA byly smíchány se vzorkovacím puforem Fermentas (Thermo Fisher Scientific Inc.) v poměru 5:1 a inkubovány v termostatu po dobu 2 min při teplotě 95°C . V aparatuře pro elektroforézu byl připraven 15% separační a 10% zaostřovací polyakrylamidový gel o tloušťce 1,5 mm. Elektroforéza byla provedena v migračním pufru při konstantním napětí 150 V po dobu 1-1,5 hodiny. Gel byl obarven 0,02% roztokem methylenové modře a následně odbarven destilovanou vodou. Densitometrická analýza gelu, zahrnující studium prooxidačních vlastností jednotlivých flavonolignanů, byla provedena s využitím programu Image J software (verze 1.4).

4.4 Elektrochemická analýza interakcí flavonolignanů silymarinového komplexu s membránami erytrocytů a HPLC-MS analýza metabolitů 3-*O*-galloylkvercetinů a 7-*O*-galloyltaxifolinu

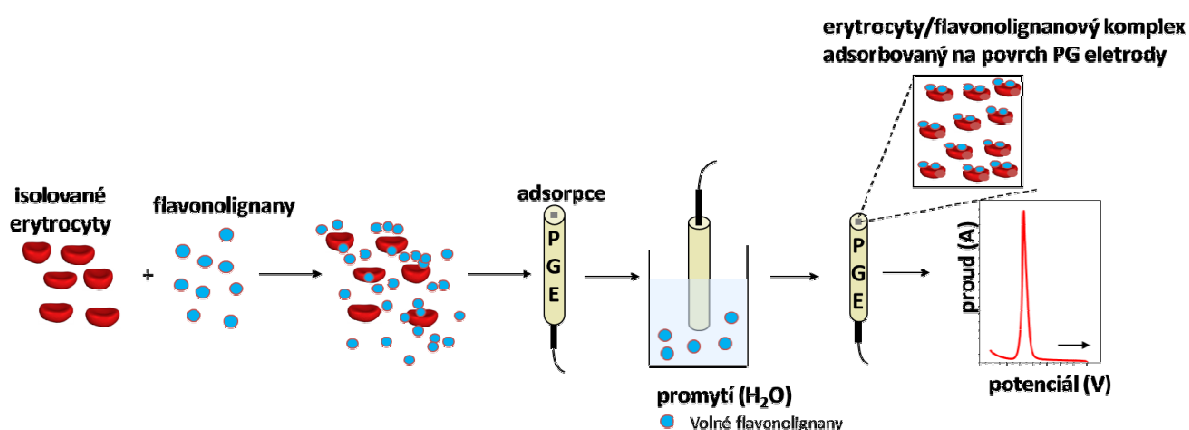
4.4.1 Interakce flavonolignanů silymarinového komplexu s membránami erytrocytů

4.4.1.1 Vazba flavonolignanů na membrány erytrocytů

Čerstvá lidská krev byla získána se souhlasem od jednoho zdravého dobrovolníka a odebrána do zkumavek s EDTA. Alikvoty plné krve byly inkubovány po dobu 10 min při pokojové teplotě se silybinem, silymarinem (10 a 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ v DMSO) a/nebo L-argininem (20 a 200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$). Červené krvinky byly následně odděleny opakovanou centrifugací při 500 x g (až 12 x) v Hankově roztoku (HBSS). Alikvoty erytrocytární suspenze (50 μl erytrocytů + 50 μl HBSS) a jejich supernatanty byly analyzovány [156].

4.4.1.2 Elektrochemická analýza flavonolignanů po vazbě na membrány erytrocytů

5 μl vzorku bylo po dobu 60 s adsorbováno na povrch elektrody z pyrolytického grafitu. Následně byla pracovní elektroda opláchnuta v deionizované H_2O a umístěna do elektrochemické cely obsahující základní elektrolyt (Britton-Robinsonův pufr pH 7,4). Parametry voltametrického měření: počáteční potenciál 0 V, konečný potenciál -1,5 V, frekvence 200 Hz, potenciálový krok 5 mV, amplituda 25 mV. Voltametrické měření probíhalo za pokojové teploty pomocí analyzátoru $\mu\text{Autolab III}$ v třielektrodovém uspořádání: pracovní elektroda (uhlíková elektroda z pyrolytického grafitu PGE), referenční elektroda (Ag/AgCl/3M KCl) a pomocná elektroda (platinový drátek).



Obrázek 9. Interakce erytrocytů s flavonolignany silymarinového komplexu a následná *ex situ* voltametrická analýza vzniklého komplexu na povrchu uhlíkové elektrody.

4.4.2 Metabolická studie 3-O-galloylkvercetinů a 7-O-galloyltaxifolinů na lidských hepatocytech

4.4.2.1 Izolace lidských hepatocytů

Lidské hepatocyty byly izolovány z části jater multiorgánových dárců dvoufázovou kolagenovou perfuzí [154]. Játra (cca 250 g) byla promyta roztoky v následujícím pořadí: HEPES 1, EGTA, HEPES 2 a roztokem HEPES 3. Poté byla játra rozmělněna v roztoku HEPES 4 a uvolněné buňky byly přefiltrovány přes sterilní gázu, centrifugovány (3 min, 50 x g, 4 °C) a promyty HEPES 4. Následovala opětovná centrifugace (3 min, 50 x g, 4 °C) a promytí kultivačním médiem (3 x). Po poslední centrifugaci byly buňky rozsuspendovány v bezsérovém médiu ISOM. Životnost a počet buněk byly stanoveny na základě barvení trypanovou modří.

4.4.2.2 Příprava suspenzních kultur lidských hepatocytů

Počet buněk byl stanoven v Bürkerově komůrce na základě barvení trypanovou modří. Hepatocyty byly naředěny bezsérovým médiem ISOM na koncentraci buněk $4 \cdot 10^6$ buněk/ml a přeneseny do baněk na rotační zařízení při teplotě vodní lázně 37 °C (obr. 10).

4.4.2.3 Příprava primárních kultur lidských hepatocytů na experimenty

Počet buněk byl stanoven v Bürkerově komůrce na základě barvení trypanovou modří. Buňky byly naředěny příslušným kultivačním médiem a vysety na 6-jamkové desky v koncentraci $1,3 \cdot 10^5$ buněk/cm². Následující den bylo médium vyměněno za bezsérové.

4.4.2.4 Příprava Balb/c 3T3 na experimenty

Počet buněk byl stanoven v Bürkerově komůrce na základě barvení trypanovou modří. Buňky byly naředěny příslušným kultivačním médiem a vysety na 96-jamkové desky v koncentraci $2 \cdot 10^4$ buněk/jamku.

4.4.2.5 Stanovení buněčného poškození

Cytotoxicita studovaných flavonoidů

K buněčné linii Balb/c 3T3 nebo kultuře lidských hepatocytů byl přidán 3-O-galloylkvercetin/7-O-galloyltaxifolin v příslušném bezsérovém médiu ve výsledných koncentracích 1, 5, 10, 25 a 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ nebo Triton X-100 1,5% (v/v). Výsledná koncentrace DMSO v médiu byla 0,1% (v/v). Kontrolní buňky byly připraveny inkubací s příslušným

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

objemem DMSO. Po inkubaci 24 h (37 °C, 5 % CO₂) byl sledován vliv flavonoidů na buněčné poškození pomocí MTT testu.

MTT test

Princip metody: Žlutá tetrazoliová sůl MTT je redukována mitochondriálními dehydrogenasami metabolicky aktivních buněk na fialové, ve vodě nerozpustné formazánové barvivo, jehož koncentrace je po rozpuštění v organickém rozpouštědle stanovena spektrofotometricky při 540 nm [160].

Postup: Buňky byly opláchnuty sterilním PBS a následně bylo aplikováno 100 μl čerstvého bezsérového média a 10 μl roztoku MTT (5 mg.ml⁻¹ PBS). Po inkubaci 2 h (37 °C, 5 % CO₂) bylo médium odsáto a do jamek bylo aplikováno 200 μl DMSO s 1% NH₃. Po 5 min byla měřena absorbance vzniklého modrofialového roztoku.

Životnost buněk byla počítána ze vztahu:

životnost (%) = (A_v/A_s) x 100; (A_v = absorbance vzorku, A_s = absorbance kontroly)

4.4.2.6 Biotransformace 3-O-galloylkvercetinů a 7-O-galloyltaxifolinů na lidských hepatocytech

Příprava vzorku pro HPLC/MS analýzu:

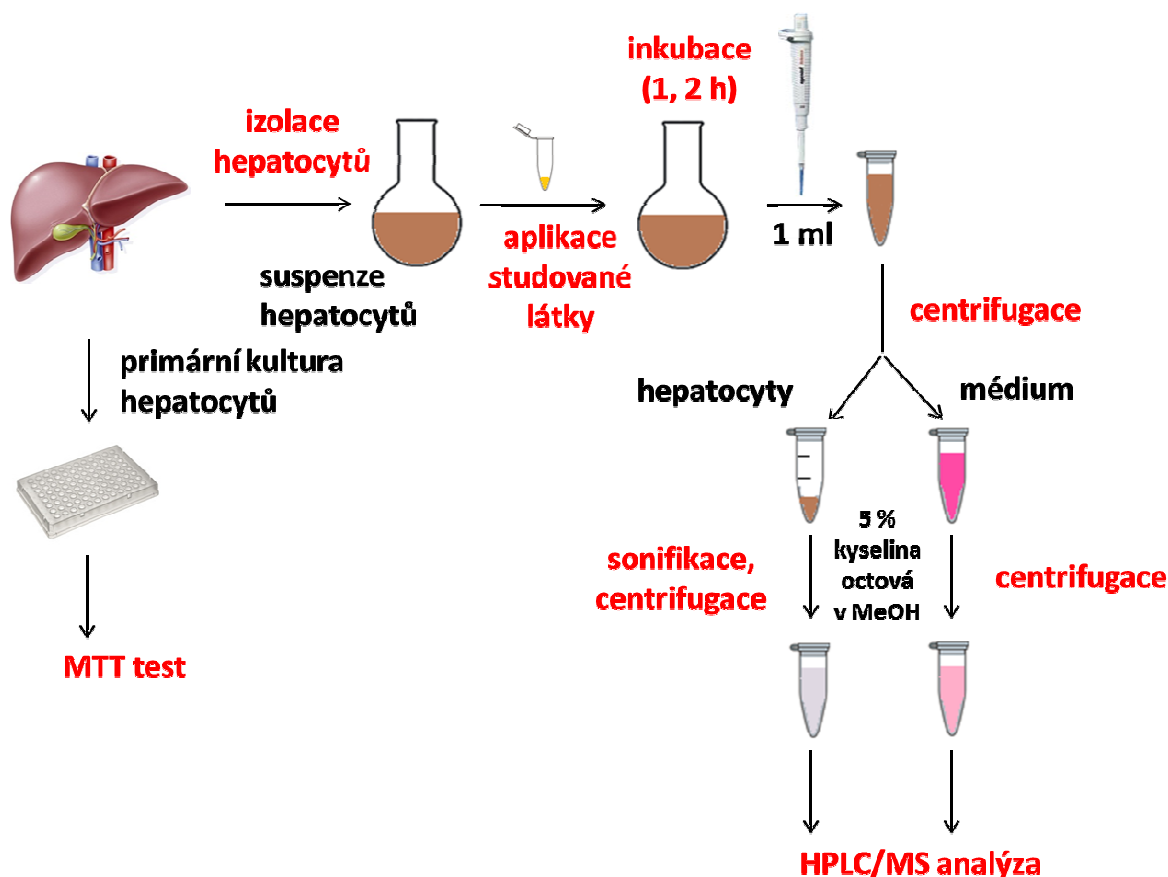
Suspenze hepatocytů (4.10⁶ buněk/ml) byly inkubovány s 0,1% (v/v) DMSO (kontrola) nebo s 50 μmol.l⁻¹ 3-O-galloylkvercetinem/7-O-galloyltaxifolinem v rotačním zařízení při 37 °C po dobu 1 a 2 hodin. Životnost hepatocytů na konci inkubace byla ověřena trypanovou modří. Po uplynutí doby inkubace byl odebrán 1 ml suspenze buněk a centrifugován (3 min při 100 x g). Médium bylo odebráno a zamraženo. Hepatocyty byly promyty 0,5 ml PBS (3 x) a zamraženy. Před HPLC/MS analýzou bylo médium smícháno s 0,2 ml methanolu obsahujícím 5% (v/v) kyselinu octovou, vzorky byly cetrifugovány (2 min, 14000 x g, 4 °C) a supernatant byl analyzován. Hepatocyty byly rozsuspendovány v 0,4 ml methanolu obsahujícím 5% (v/v) kyselinu octovou a sonikovány 10 s (amplituda 50 %, doba pulsu 0,5 s). Vzorky byly cetrifugovány (2 min, 14000 x g, 4 °C) a supernatant byl analyzován (obr. 10).

HPLC/ESI-QqTOF MS analýza

HPLC/ESI-QqTOF MS analýza byla prováděna na chromatografickém systému Acquity UPLC s chromatografickou kolonou Agilent Phenyl Zorbax XDB (150 mm x 2,1 mm, i.d., 5 μm;). Binární gradientová eluce byla provedena s průtokovou

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

rychlostí $0,4 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, teplotou kolony $35 \text{ }^\circ\text{C}$. Složení mobilní fáze A: 1% kyselina octová a methanol 90:10 (v/v), mobilní fáze B: čistý methanol. Program gradientu: 0-14 min 10-50 % B; 14-16 min 50-100 % B; 16-18 min 100-10 % B; 18-20 min 10 % B. Nastříkané množství vzorku bylo $5 \mu\text{l}$. Kapalinový chromatograf byl on-line napojen na hmotnostní spektrometr Waters QqTOF Premier Mass Spectrometer. Vzorky byly ionizovány elektrosprejem v negativním modu s následujícími parametry: napětí zdroje 2,1 kV, teplota kapiláry $300 \text{ }^\circ\text{C}$, napětí na kapiláře 40 V. Dusík byl použit jako sušící plyn a helium jako kolizní plyn. Průtok sušícího plynu byl $500 \text{ l}\cdot\text{h}^{-1}$. Doba skenování byla 0,5 s v rozsahu 50 až 1000 Da . Nižší kolizní energie pro MS sken byla 5 eV a vyšší kolizní energie pro MS^E byla v rozsahu 20-35 eV. Spektrometr byl kalibrován na standardní roztok mravenčanu sodného. Data byla kalibrována na externí referenční vzorek leucin-enkefalín ($200 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ve směsi voda:acetonitril:kyselina mravenčí; 100:100:0,2; s průtokovou rychlostí $5 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$) a vyhodnocena pomocí softwaru MetaboLynx V4.1 (Waters Corp., USA).



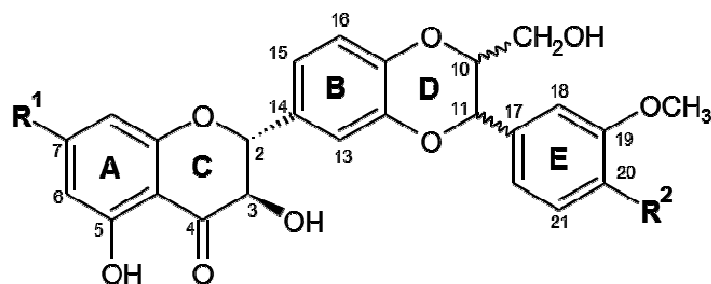
Obrázek 10. Přípravy lidských hepatocytů pro stanovení toxicity a identifikaci biotransformačních produktů.

5. VÝSLEDKY

5.1 *Ex situ* a *in situ* elektrochemická analýza flavonolignanů pomocí uhlíkových elektrod

5.1.1 Oxidace a adsorpce flavonolignanů na povrch elektrod

Silybin (směs diastereomerů A a B v přibližném poměru 1:1), jeho dva selektivně methylované deriváty, 2,3-dehydrosilybin a isosilybin (obr. 11) byly nejdříve rozpuštěny (viz 4.3.1), naředěny do 0,2 mol.l⁻¹ fosfátového pufru (pH 7,4) a studovány *in situ* (viz 4.3.2.2) a *ex situ* (viz 4.3.2.1) cyklickou volumetrií (CV) a voltametrií s vkládaným pravoúhlým napětím (SWV) (obr. 12) na pyrolytické grafitové elektrodě (PGE). Studované látky v adsorbovaném stavu podléhají víceetapňové oxidaci striktně závislé na pH základního elektrolytu. Na voltamogramech silybinu, isosilybinu a 7-*O*-methylsilybinu byly pozorovány při pH 7,4 dva oxidační píky, oxidační pík 1, $E_{p1} = +0,50$ V a oxidační pík 2, $E_{p2} = +0,85$ V. V případě 20-*O*-methylsilybinu byl pozorován pouze druhý oxidační pík. U 2,3-dehydrosilybinu se kromě oxidačních píků 1 a 2 navíc objevuje oxidační pík 3 při potenciálu nižším, $E_{p3} = +0,30$ V, než jsou potenciály oxidačních píků 1 a 2. Při skenu od 0 do +1 V byla pozorována reverzibilita oxidačního píku 1. Oxidační pík 2 a 3 (u 2,3-dehydrosilybinu) odpovídá ireverzibilnímu elektrodovému ději (obr. 12). Reverzibilita oxidačního píku 1 byla potvrzena také rozložením SW voltamogramu ($I_{net} = I_f + I_b$). S rostoucím počtem CV skenů se výšky píků (velikost anodického proudu) snižují. Pokud je elektroda polarizovaná $E > +1$ V, žádný pík v katodické větvi cyklického voltamogramu nepozorujeme.

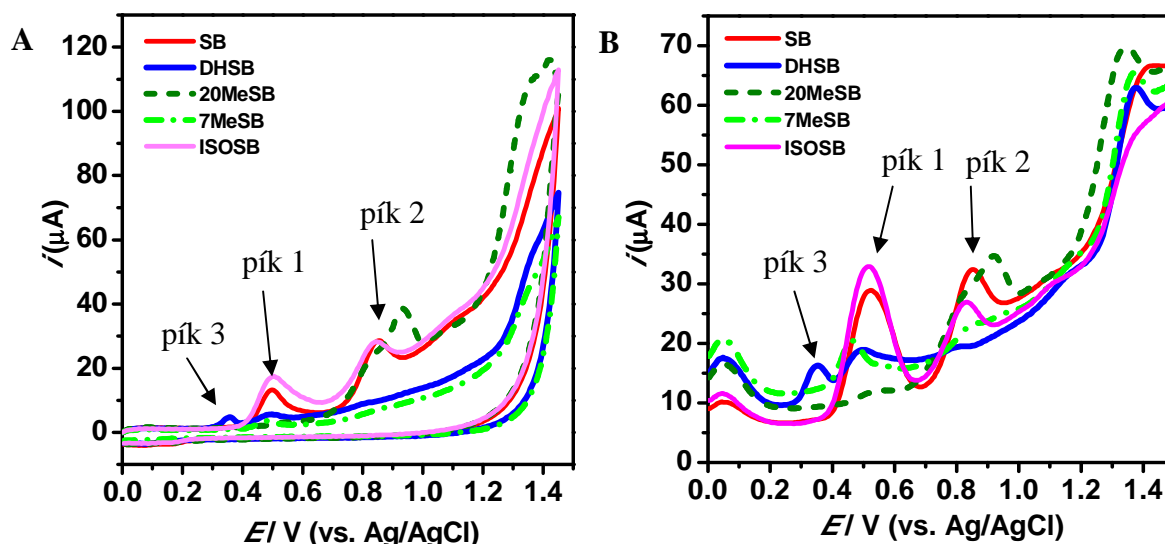


sloučenina	R ¹	R ²
silybin	OH	OH
2,3-dehydrosilybin*	OH	OH
20- <i>O</i> -methylsilybin	OH	OCH ₃
7- <i>O</i> -methylsilybin	OCH ₃	OH

*) 2,3-dvojná vazba

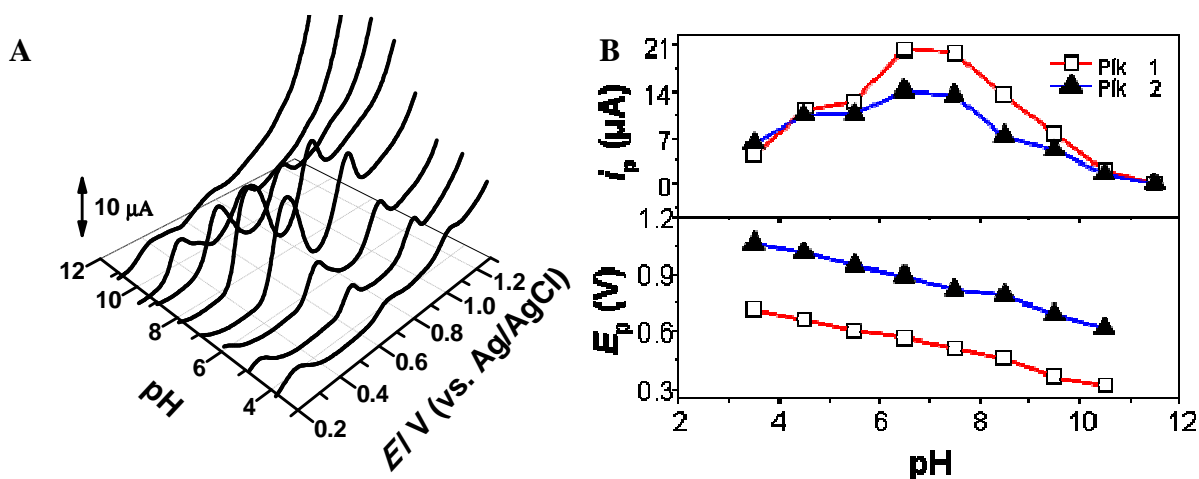
Obrázek 11. Struktura silybinu, jeho methylovaných derivátů a 2,3-dehydrosilybinu.

VÝSLEDKY



Obrázek 12. (A) Cyklické a (B) square wave voltamogramy silybinu (SB), 2,3-dehydrosilybinu (DHSB), 20-*O*-methylsilybinu (20MeSB), isosilybinu (ISOSB) a 7-*O*-methylsilybinu (7MeSB). Experimentální podmínky: doba akumulace 60 s, koncentrace látek $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, základní elektrolyt fosfátový pufr (pH 7,4). CV parametry: počáteční potenciál 0 V, potenciál obratu +1,5 V, potenciálový krok 5 mV, rychlost skenu $1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$. SWV parametry: počáteční (0 V) a koncový (+1,5 V) potenciál, potenciálový krok 5 mV, amplituda 25 mV, frekvence 200 Hz.

Oxidace flavonolignanů je striktně závislá na pH základního elektrolytu. U silybinu pozorujeme nejvyšší proudové odezvy (i_p) v rozmezí pH 6-7,5. Velmi podobné chování vykazují jeho deriváty kromě 2,3-dehydrosilybinu, kdy nejvyšší proudovou odezvu pozorujeme při pH 5. Kromě vlivu pH na výšku píků byla také pozorovaná závislost pH na potenciálu píků (E_p). S rostoucím pH základního elektrolytu dochází k posunu potenciálů oxidace směrem k méně pozitivním hodnotám. S jednotkou pH se potenciál oxidačních píků posouvá o $\sim 59 \text{ mV}$ (obr.13).

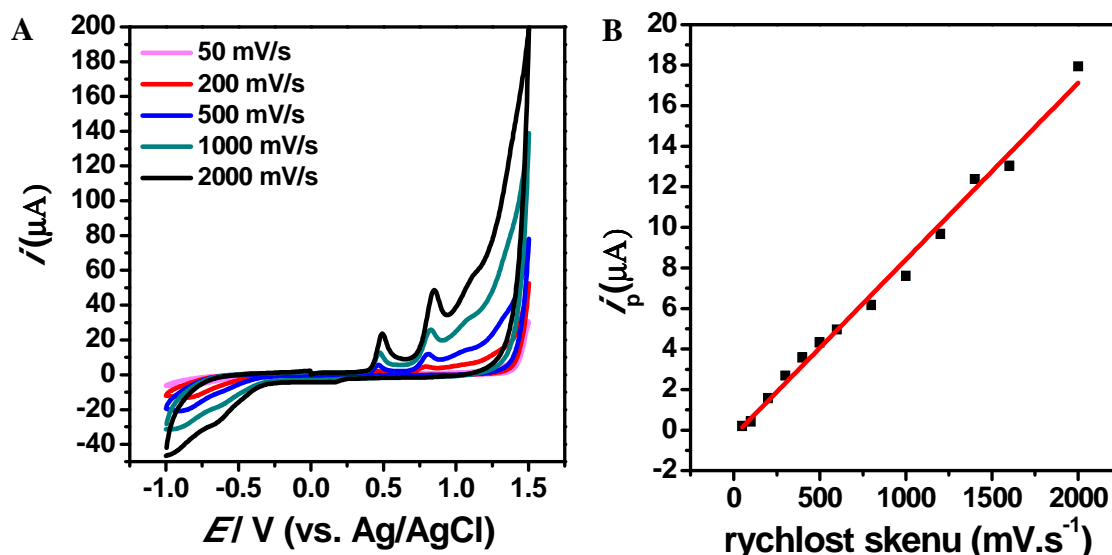


Obrázek 13. (A) 3D voltamogramy silybinu při pH 3,5-10,5. (B) Závislost výšky (i_p) a potenciálu (E_p) oxidačních píků 1 a 2 silybinu na pH základního elektrolytu. Experimentální podmínky: metoda SWV, doba akumulace 60 s, koncentrace silybinu $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$, základní elektrolyt Britton-Robinsonův pufr (pH 3,5-10,5). SWV parametry: počáteční (0 V), koncový (+1,5 V) potenciál, frekvence 200 Hz, amplituda 25 mV, potenciálový krok 5 mV.

Flavonolignany na povrchu elektrody podléhají redoxním dějům, kdy dochází k výměně elektronů a protonů v závislosti na pH elektrolytu. Kromě výše popsaných faradaických dějů je oxidace flavonolignanů na povrchu elektrody ovlivněna adsorpcí. Adsorpci můžeme experimentálně potvrdit dvěma způsoby. Sledováním závislosti velikosti proudu oxidačních píků na rychlosti polarizace elektrody a na době akumulace látek na povrchu elektrody [161].

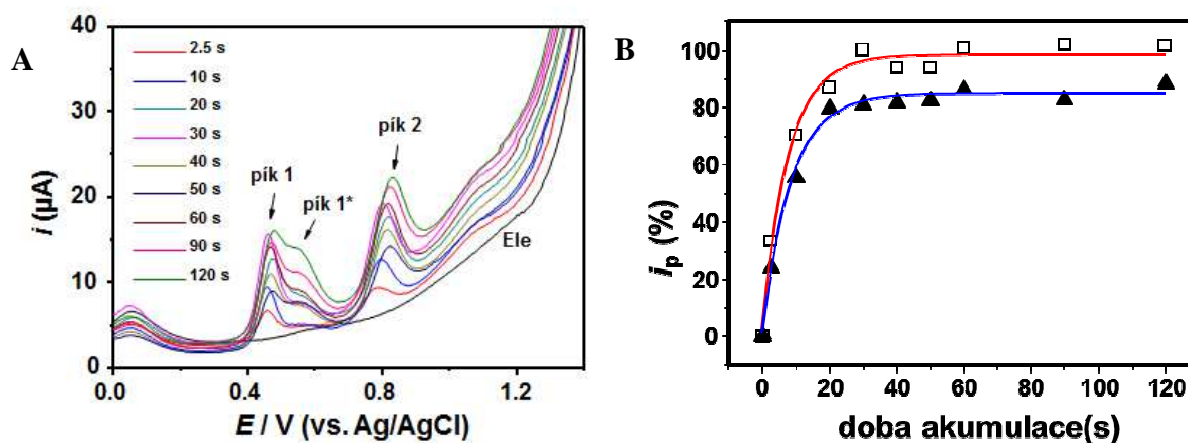
Adsorpční chování bylo nejdříve studováno závislostí velikosti proudové odezvy oxidačního píku 1 silybinu na rychlosti polarizace elektrody ($50\text{-}2000 \text{ mV.s}^{-1}$), kdy linearita uvedené závislosti ($y = 0,00871x - 0,2969$ a $R = 0,9913$) ukazuje na děje řízené adsorpcí (obr. 14).

VÝSLEDKY



Obrázek 14. (A) Voltamogramy silybinu při různých rychlostech skenu. (B) Závislost výšky (i_p) oxidačního píku 1 silybinu na rychlosti polarizace elektrody. Experimentální podmínky: doba akumulace: 60 s, koncentrace silybinu: $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, základní elektrolyt: fosfátový pufr (pH 7,4), CV parametry: počáteční (-1 V), potenciál obratu (+1,5 V), koncový potenciál (-1V) amplituda 25 mV, potenciálový krok 5 mV.

Výše uvedený experiment byl proveden při plně pokrytém povrchu PGE flavonolignany. Kinetika adsorpce silybinu je ukázána na obr. 15. S rostoucí dobou akumulace se objevuje pík 1*, který pravděpodobně souvisí s tvorbou adsorbované vrstvy.



Obrázek 15. (A) Voltamogramy silybinu při různých časech adsorpce. (B) \square je závislost výšky oxidačního píku 1 a \blacktriangle je závislost výšky oxidačního píku 2 silybinu na době akumulace, 100% = výška oxidačního píku 1 po akumulaci 30 s. Experimentální podmínky: metoda SWV, koncentrace silybinu $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, základní elektrolyt Britton-Robinsonův pufr

VÝSLEDKY

(pH 3,5-10,5). SWV parametry: počáteční (0 V), koncový (+1,5 V) potenciál, frekvence 200 Hz, amplituda 25 mV, potenciálový krok 5 mV.

5.1.2 Antioxidační a chelatační vlastnosti flavonolignanů

Na základě hodnot potenciálů prvních oxidačních píků studovaných látek můžeme usuzovat o schopnosti látek odevzdávat elektrony a protony. Čím je hodnota potenciálu prvního oxidačního píku nižší, tím snadněji se látka oxiduje a má tedy vyšší antiradikálovou resp. antioxidační aktivitu [126].

Potenciály prvního oxidačního píku flavonolignanů byly porovnány s potenciály prvních oxidačních píků flavonolů a taxifolinu. 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ roztoky flavonolignanů, flavonolů a taxifolinu byly rozpuštěny (viz 4.3.1), naředěny do Britton-Robinsonova pufru (pH 3,5; 7,4 a 12) a měřeny *in situ* (viz 4.3.2.2) a *ex situ* (viz 4.3.2.1) voltametrií. Potenciály píků uvedených v tabulce 3 jsou naměřeny pomocí *in situ* CV, hodnoty odečtené ze SW voltamogramů jsou obdobné s odchylkou $\pm 0,05$ V.

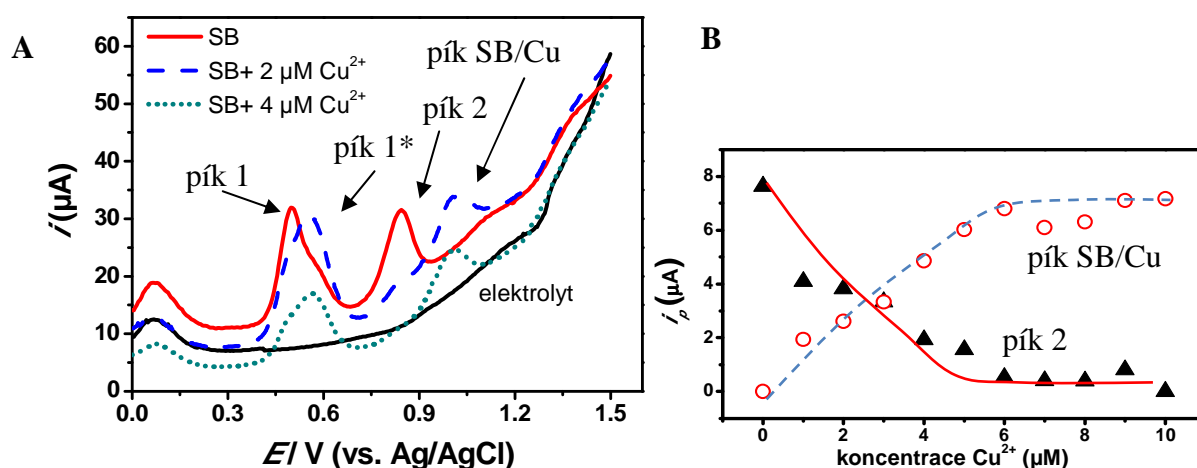
Tabulka 3. Potenciály oxidačních píků (E_p) flavonolignanů, flavonolů a taxifolinu; měřeno AdT CV. Experimentální podmínky i CV parametry stejné jako u obr. 12, \uparrow míra antioxidační kapacity.

flavonoid		pH 3,5			pH 7,4			pH 12,0		
		E_{p1}	E_{p2}	E_{p3}	E_{p1}	E_{p2}	E_{p3}	E_{p1}	E_{p2}	E_{p3}
<i>flavonolignany</i>										
silybin	\uparrow	0,75	1,13		0,54	0,84		0,23	0,47	
2,3-dehydrosilybin	$\uparrow\uparrow$	0,73	1,10	0,55	0,48	0,83	0,36			
7-O-methylsilybin	\uparrow	0,85	1,17		0,49	0,89		0,21		
20-O-methylsilybin			1,13			0,96			0,48	
isosilybin	\uparrow	0,77	1,14		0,53	0,88		0,23	0,45	
<i>flavonoly*</i>										
kvercetin	$\uparrow\uparrow\uparrow\uparrow$				0,12	0,89				
rutin	$\uparrow\uparrow\uparrow$				0,25	0,86				
isokvercitrin	$\uparrow\uparrow\uparrow$				0,25	0,84				
taxifolin*	$\uparrow\uparrow\uparrow\uparrow$				0,18					

*) testováno pouze pro pH 7,4

VÝSLEDKY

Interakce silybinu s ionty přechodných kovů (Ni^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} a Zn^{2+}) byla studována *ex situ* SWV voltametrií (viz 4.3.2.1). Po inkubaci silybinu (viz 4.3.5.1) s výše uvedenými ionty přechodných kovů došlo ve všech případech k poklesu anodických pík silybinu. Byla pozorována vysoká afinita silybinu k Cu^{2+} iontům (hodnoceno na základě poklesu výšky oxidačních pík po přidavku kovu). Při koncentraci silybinu $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$ dochází po přidavku Cu^{2+} iontů o koncentraci $0-5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ k poklesu oxidačního píku 2 silybinu a nárůstu nového oxidačního píku při potenciálu $E_p = +1,0 \text{ V}$. Pro koncentrace Cu^{2+} iontů vyšších než $5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ zůstává velikost proudové odezvy konstantní (obr. 16A). Stechiometrický poměr komplexu silybin/Cu byl určen 2:1. Komplex silybin/Cu po přidavku EDTA o koncentraci $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$ disociuje, což je prokázáno přítomností původních oxidačních pík silybinu (obr. 16B).

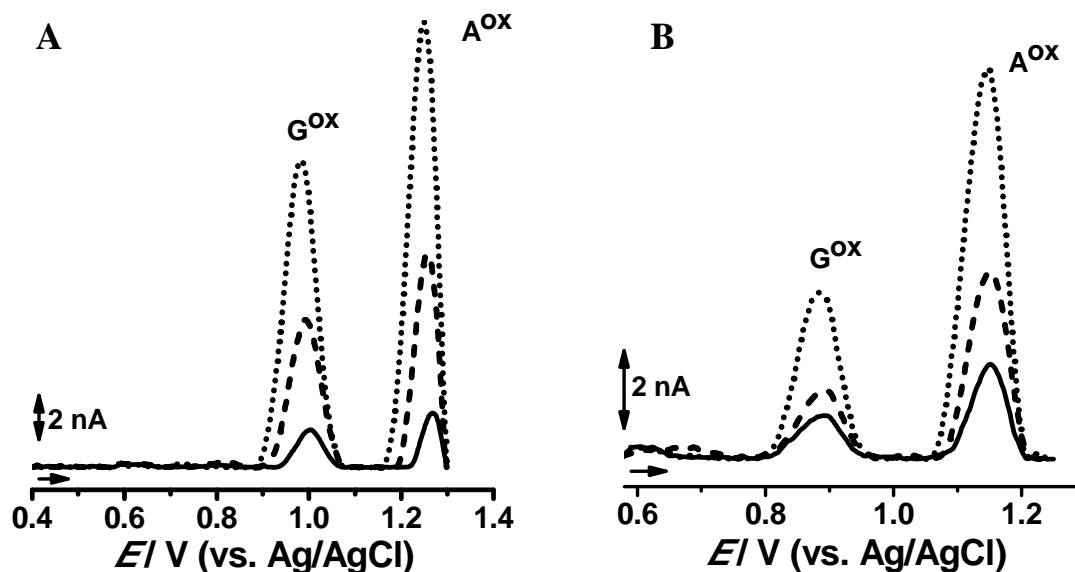


Obrázek 16. (A) SW voltamogramy silybinu a jeho komplexu s Cu^{2+} a (B) závislost oxidačního píku 2 silybinu a píku SB/Cu na koncentraci Cu^{2+} . Experimentální podmínky: koncentrace silybinu $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$, základní elektrolyt fosfátový pufr (pH 7,4), doba adsorpce 60 s. SWV parametry: počáteční (0 V), koncový (+1,5 V) potenciál, frekvence 200 Hz, amplituda 25 mV, potenciálový krok 5 mV.

5.1.3 Interakce flavonoidů s DNA

5.1.3.1 Elektrochemická analýza dsDNA

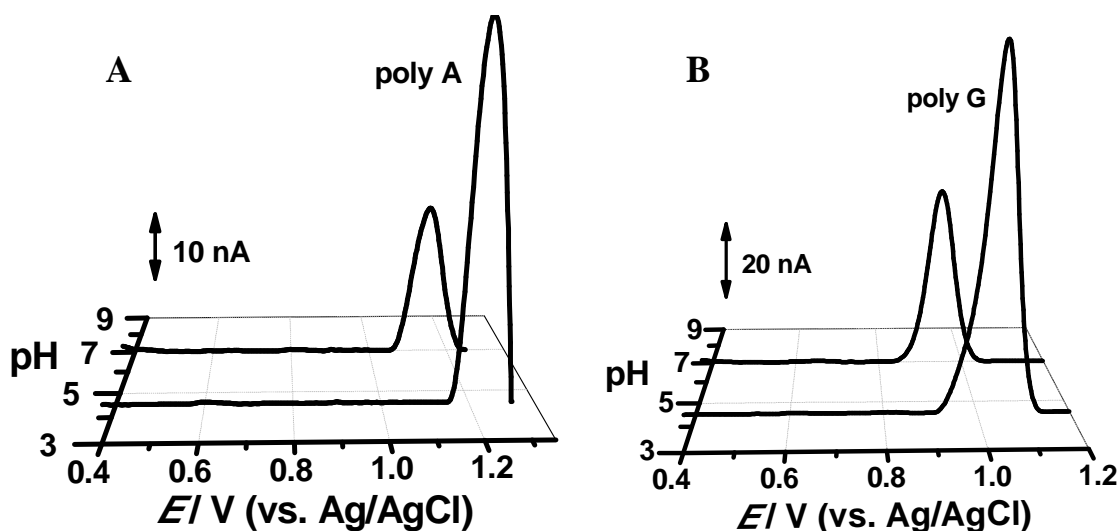
Po rozpuštění a naředění dsDNA (viz 4.3.3) na požadovanou koncentraci, byla provedena elektrochemická analýza v acetátovém (pH 5) a fosfátovém (pH 7) pufru na elektrodě ze skelného uhlíku (GCE) a pyrolytického grafitu. Na DP voltamogramu pozorujeme oxidační píky guaninu (G^{ox}) a adeninu (A^{ox}), výška píků je závislá na koncentraci dsDNA a pH elektrolytu (obr.17).



Obrázek 17. DP voltamogram dsDNA o koncentraci (—) $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, (---) $150 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, (•••) $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ v (A) acetátovém (pH 5) a (B) fosfátovém (pH 7) pufru. DPV parametry: pulzní amplituda 50 mV, doba pulzu 70 ms, rychlost skenu $5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Jednotlivé píky byly identifikovány na základě elektrochemické analýzy poly[G] a poly[A] v acetátovém (pH 5) a fosfátovém (pH 7) pufru (obr. 18).

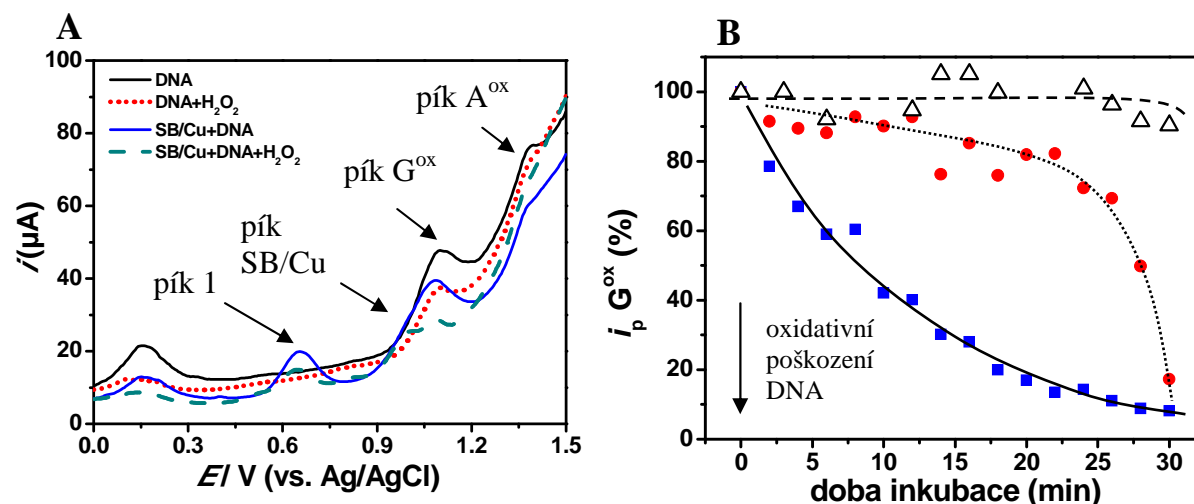
VÝSLEDKY



Obrázek 18. DP voltamogram (A) poly[A] o koncentraci $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a (B) Poly[G] o koncentraci $150 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ v acetátovém (pH 5) a fosfátovém (pH 7) pufru. DPV parametry: pulzní amplituda 50 mV, doba pulzu 70 ms, rychlost skenu $5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

5.1.3.2 Interakce flavonolignanů s DNA

Byla zkoumána interakce dsDNA a ssDNA s flavonolignany (viz 4.3.5.3), silybinem a jeho 2,3-dehydroderivátem. V případě silybinu i 2,3-dehydrosilybinu došlo pouze k mírnému poklesu oxidačních píků flavonolignanů i píků souvisejících s oxidací DNA bází, a to primárně v důsledku kompetice obou komponent o povrch pracovní elektrody. Dále byly vzorky flavonolignanů a komplexy flavonolignanů s ionty kovu (Cu^{2+}) inkubovány v přítomnosti oligonukleotidů bohatých na guaninové a adeninové báze. V obou případech došlo k poklesu oxidačních píků flavonolignanů i píků souvisejících s oxidací DNA bází, a to především při analýze DNA v přítomnosti komplexů flavonolignan/kov. Po přidání H_2O_2 k DNA a studovaným komplexům byly pozorovány poklesy oxidačních píků v závislosti na čase. Kinetická křivka je ukázána na obr. 19. Jako kontrolní vzorek byla analyzována DNA v přítomnosti Cu^{2+} a H_2O_2 (kdy dochází relativně rychle k oxidaci guaninových bází v důsledku velkého množství reaktivních forem kyslíku - pozitivní kontrola) a DNA v přítomnosti H_2O_2 (kdy nedochází k produkci volných radikálů - negativní kontrola).



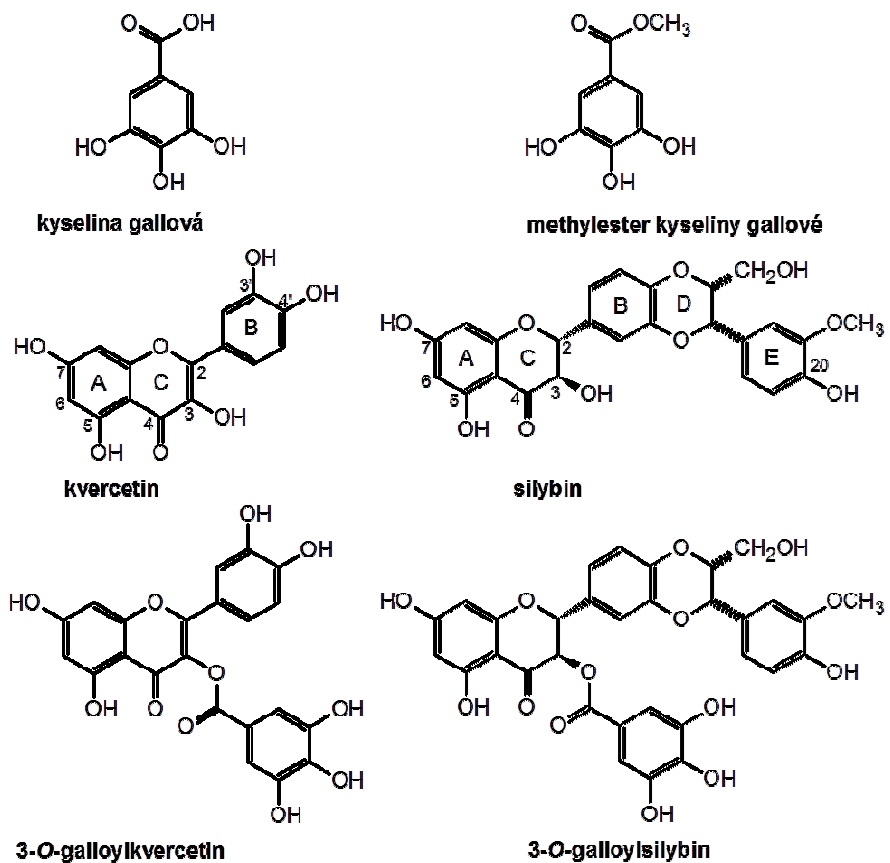
Obrázek 19. (A) SW voltamogramy silybin/Cu komplexu s ssDNA v přítomnosti či nepřítomnosti H_2O_2 . (B) Závislost výšky G^{ox} na době inkubace ssDNA s H_2O_2 (Δ), Cu^{2+} a H_2O_2 (\blacksquare) a silybin/Cu komplex + H_2O_2 (\bullet); 100% = výška G^{ox} nativní DNA. Experimentální podmínky: koncentrace silybin/Cu komplexu $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$, koncentrace ssDNA $20 \mu\text{g.ml}^{-1}$, 6% H_2O_2 , základní elektrolyt acetátový pufr (pH 5). SWV parametry: počáteční (0 V), koncový (+1,5 V) potenciál, frekvence 200 Hz, amplituda 25 mV, potenciálový krok 5 mV.

5.1.4 Vliv substituce gallátem na elektrochemickou oxidaci silybinu a kvercetin, antioxidační a prooxidační vlastnosti

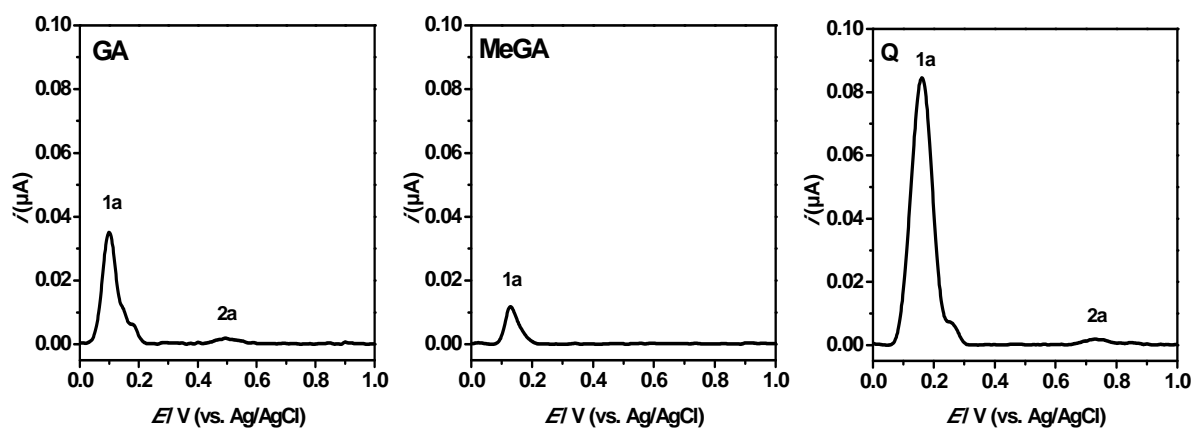
5.1.4.1 Oxidace 3-O-galloylsilybinu a 3-O-galloylkvercetin

Pro identifikaci dějů odpovědných za oxidační píky 3-O-galloylsilybinu (SBG) a 3-O-galloylkvercetin (QG) byla provedena srovnávací studie s $5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ kyselinou gallovou, jejím methylesterem a samotným kvercetinem a silybinem (obr. 20). Studované látky byly nejdříve rozpuštěny (viz 4.3.1), naředěny a analyzovány *in situ* voltametrií (viz 4.3.2.2) na GCE. DP voltamogramy kyseliny gallové a jejího methylesteru ukázaly dva oxidační píky, oxidační pík 1a při potenciálu, $E_{p1a} = +0,12 \text{ V}$, a oxidační pík 2a, při potenciálu, $E_{p2a} = +0,49 \text{ V}$ (obr. 21). Velikost proudové odezvy oxidačního píku 2a byla několikanásobně menší v porovnání s oxidačním píkem 1a. U methylderivátu byl tento pík pozorován pouze za určitých experimentálních podmínek (při nižším pH základního elektrolytu). Na voltamogramu kvercetin a silybinu byly pozorovány dva oxidační píky, při potenciálech $E_{p1a} = +0,16 \text{ V}$ a $E_{p2a} = +0,74 \text{ V}$ pro kvercetin a $E_{p1a} = +0,47 \text{ V}$ a $E_{p2a} = +0,74 \text{ V}$ pro silybin (obr. 21).

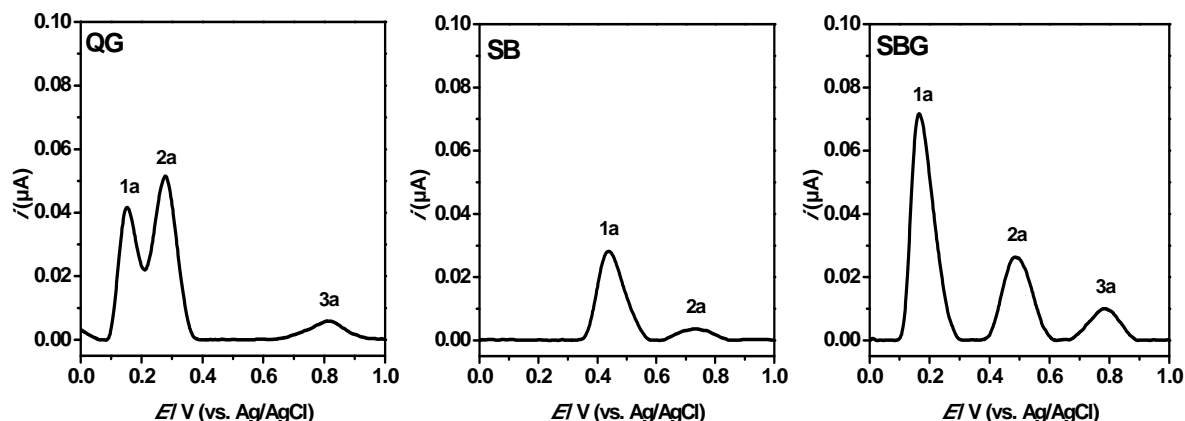
VÝSLEDKY



Obrázek 20. Struktura kyseliny gallové, jejího methylesteru, kvercetinu, silybinu, 3-O-galloylkvercetinu a 3-O-galloylsilybinu.

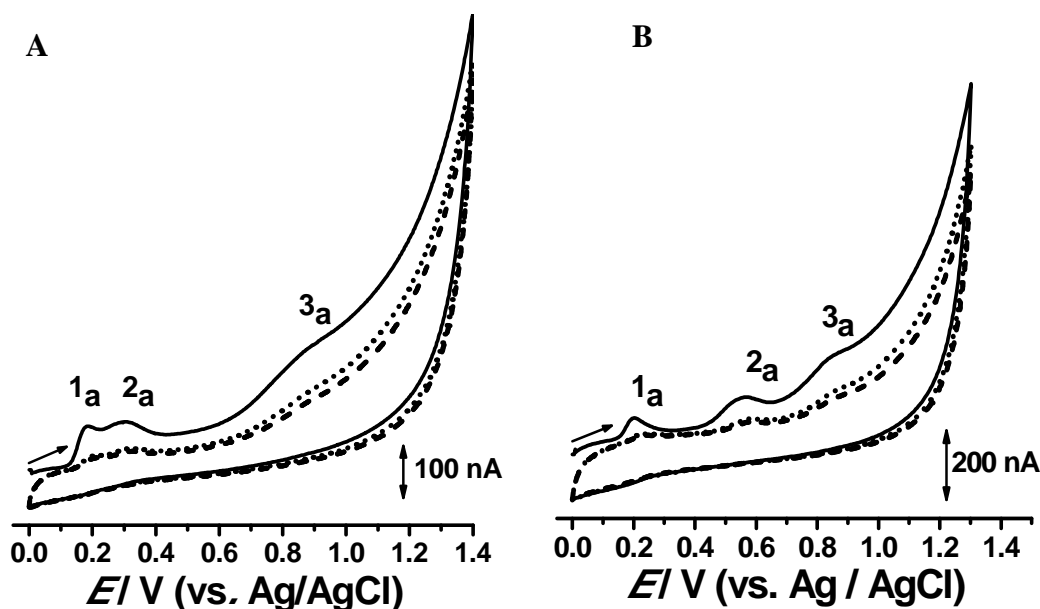


VÝSLEDKY



Obrázek 21. DPV voltamogramy $5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ kyseliny gallové (GA), methylesteru kyseliny gallové (MeGA), kvercetinu (Q) a $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$ 3-*O*-galloylkvercetinu (QG), silybinu (SB) a 3-*O*-galloylsilybinu (SBG) ve fosfátovém pufru (pH 7), DPV parametry: pulzní amplituda 50 mV, doba pulzu 70 ms, rychlost skenu 5 mV.s^{-1} .

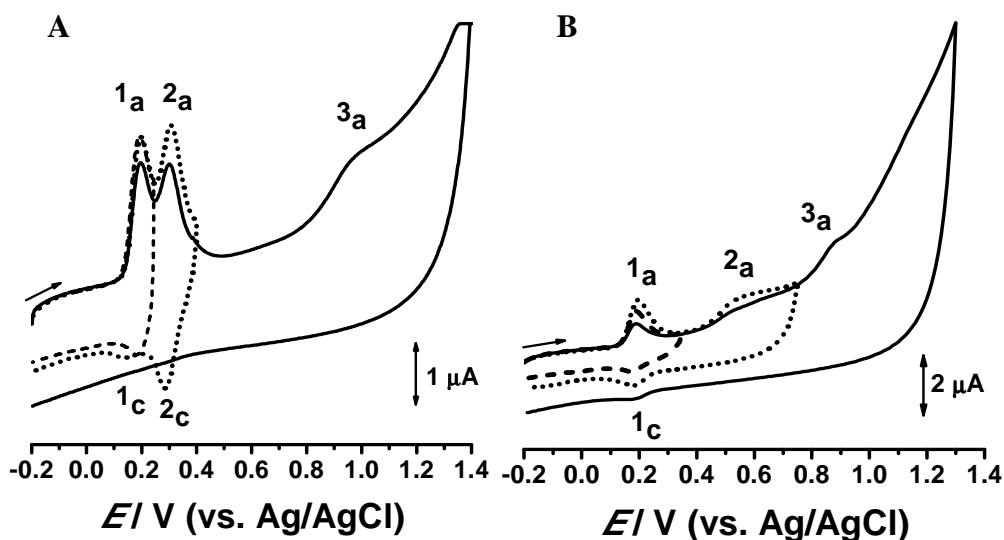
Elektrochemické chování 3-*O*-galloylsilybinu a 3-*O*-galloylkvercetinu bylo zkoumáno pomocí CV (obr. 22). 3-*O*-galloylkvercetin se oxiduje ve třech stupních při potenciálech $E_{p1a} = +0,19 \text{ V}$, $E_{p2a} = +0,27 \text{ V}$ a $E_{p3a} = +0,87 \text{ V}$. 3-*O*-galloylsilybin podléhá též třístupňové oxidaci při potenciálech, $E_{p1a} = +0,17 \text{ V}$, $E_{p2a} = +0,55 \text{ V}$ a $E_{p3a} = +0,83 \text{ V}$.



Obrázek 22. CV voltamogramy (A) $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ 3-*O*-galloylkvercetinu a (B) $20 \mu\text{mol.l}^{-1}$ 3-*O*-galloylsilybinu; základní elektrolyt: fosfátový pufr (pH 7), počáteční potenciál (0 V), potenciál obratu (+1,3 V), koncový (0 V); rychlost skenu 25 mV.s^{-1} .

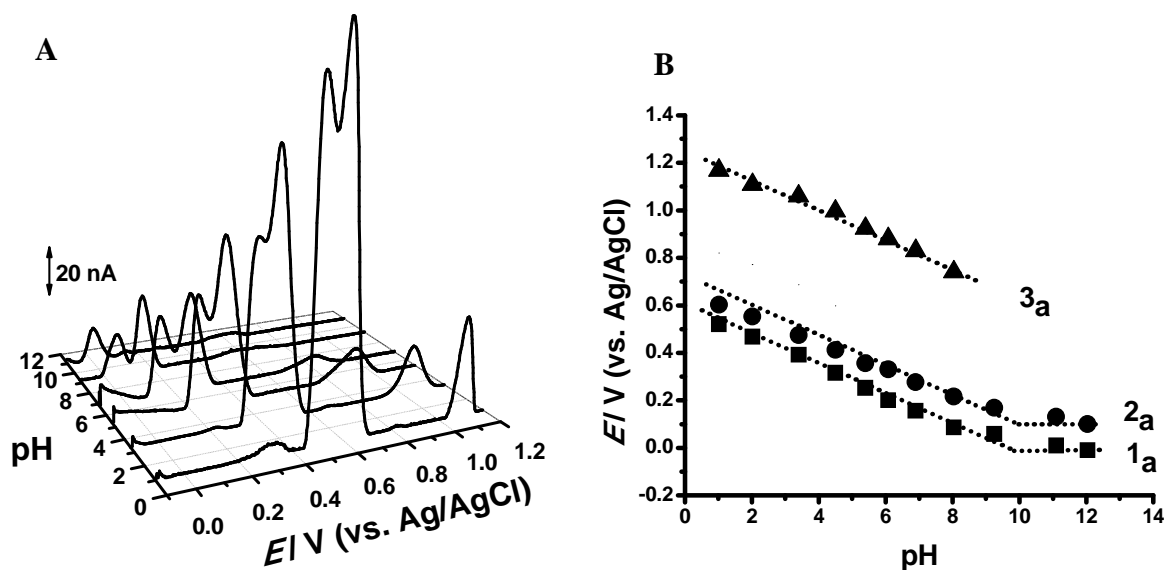
VÝSLEDKY

Reverzibilita oxidačních píků 3-*O*-galloylsilybinu a 3-*O*-galloylkvercetinů byla zkoumána CV v rozmezí potenciálů uvedených v legendě u obr. 23 s rychlostí skenu 1 V.s⁻¹. Metodou SWV byla ověřena reverzibilita oxidačních píků.

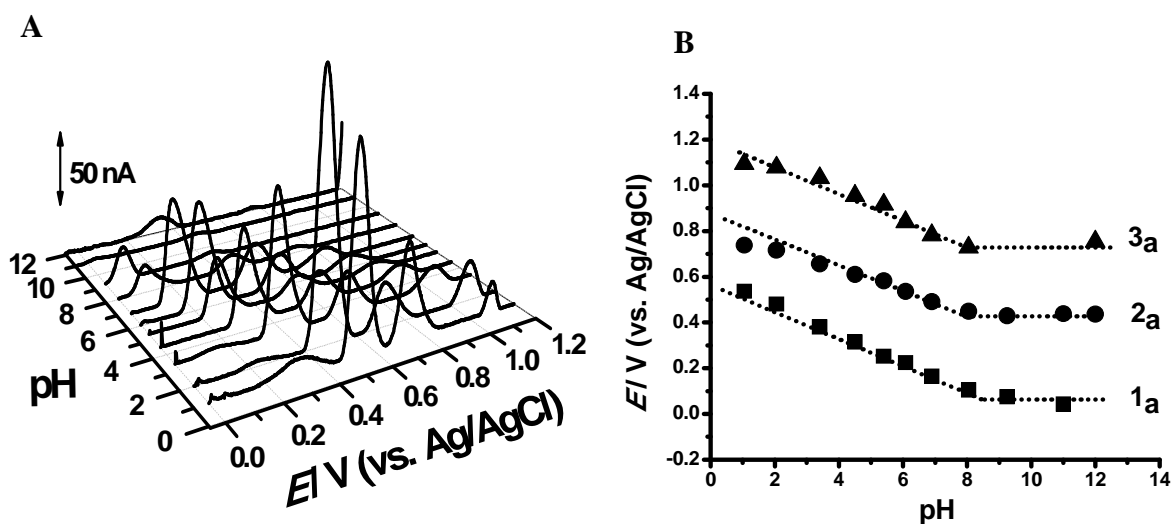


Obrázek 23. CV voltamogramy 20 μmol.l⁻¹: (A) 3-*O*-galloylkvercetinů a (B) 3-*O*-galloylsilybinů, základní elektrolyt fosfátový pufr (pH 7), CV parametry: (A) počáteční potenciál -0,2 V, potenciál obratu (—) +1,3 V, (•••) +0,4 V a (---) +0,2 V, koncový potenciál -0,2 V, (B) počáteční potenciál -0,2 V, potenciál obratu (—) +1,3 V, (•••) +0,7 V a (---) +0,3 V, koncový potenciál -0,2 V; rychlost skenu 1.0 V.s⁻¹.

Závislost velikosti proudu a potenciálu oxidačních píků na pH elektrolytu byla studována v širokém rozmezí pH (1,2 - 12,04). S klesajícím pH dochází k posunu potenciálů oxidačních píků k více pozitivním hodnotám (obr. 24 a 25). Od pH > 10 oxidační proces není závislý na pH pro 3-*O*-galloylkvercetin a od pH > 8 pro 3-*O*-galloylsilybin.



Obrázek 24. (A) DP voltamogram $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ 3-*O*-galloylquercetinu a (B) odpovídající závislost potenciálů (■) E_{p1a} , (●) E_{p2a} a (▲) E_{p3a} na pH, rychlost skenu 5 mV.s^{-1} .

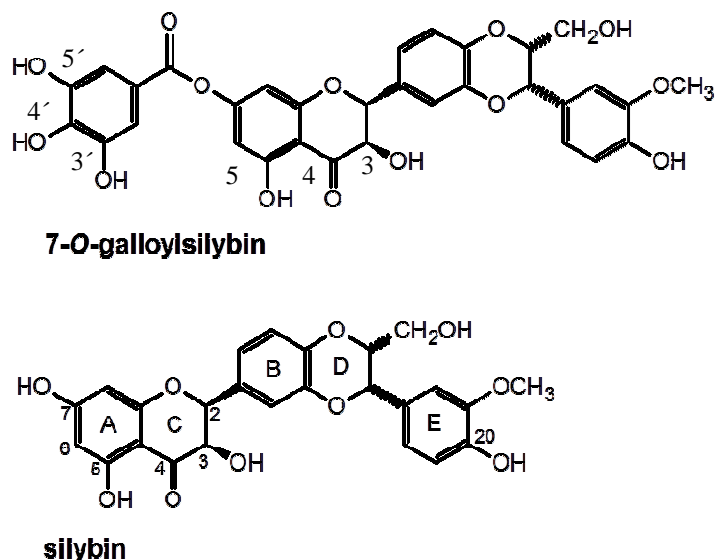


Obrázek 25. (A) DP voltamogram $20 \mu\text{mol.l}^{-1}$ 3-*O*-galloylsilybinu a (B) odpovídající závislost potenciálů (■) E_{p1a} , (●) E_{p2a} a (▲) E_{p3a} na pH, rychlost skenu 5 mV.s^{-1} .

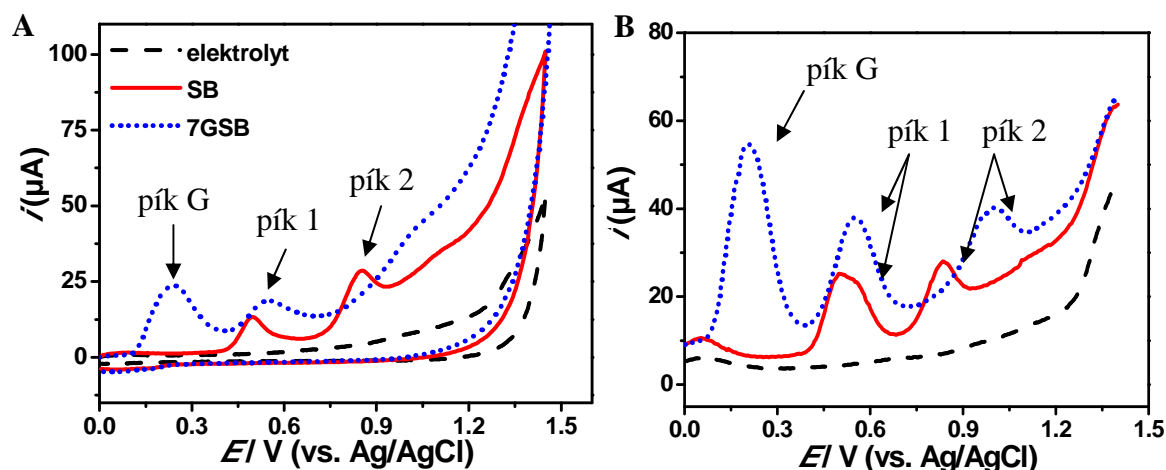
5.1.4.2 Antioxidační vlastnosti

Pomocí voltametrických metod byl zkoumán vliv substituce gallátem na oxidaci silybinu (obr. 26). Jak můžeme vidět na CV resp. SWV voltamogramech (obr. 27) 7-*O*-galloylsilybinu, oxidační pík související s oxidací pyrogallové skupiny (pík G) leží při nižších hodnotách potenciálu v porovnání s prvním oxidačním píkem silybinu.

VÝSLEDKY



Obrázek 26. Struktura 7-O-galloylsilybinu a silybinu.

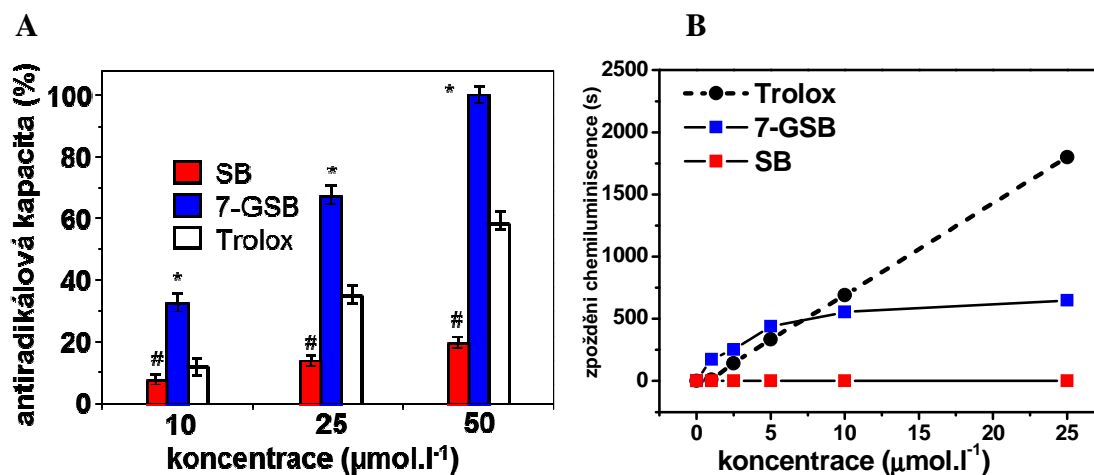


Obrázek 27. (A) CV a (B) SW voltamogramy $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ silybinu (SB) a 7-O-galloylsilybinu (7GSB) základní elektrolyt fosfátový pufr (pH 7,4), doba akumulace 30 s, CV parametry: počáteční potenciál (0 V), potenciál obratu (+1,5 V), koncový potenciál (0 V), rychlost skenu 1 V.s^{-1} , SWV parametry: počáteční (0 V) a koncový (+1,5 V) potenciál, frekvence 200 Hz.

Antiradikálová aktivita a celková antioxidační kapacita byla dále studována pomocí DPPH testu a chemiluminiscence. K určení antiradikálové aktivity byla použita metoda zhášení DPPH radikálu (viz 4.3.4.1) (obr. 28). Výsledek byl vyjádřen jako schopnost studovaných látek (v koncentracích 10, 25 a $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$) vychytávat difenylpikrylhydrazylový radikál v porovnání s troloxem. Antiradikálová aktivita 7-O-galloylsilybinu je vyšší než u samotného silybinu i troloxu. Dále byla studována celková antioxidační kapacita pomocí chemiluminiscence (viz 4.3.4.2). Výsledek byl vyjádřen jako čas v sekundách, po který

VÝSLEDKY

studované látky byly schopny inhibovat světelnou emisi [159]. Zpoždění chemiluminiscence koresponduje s narůstající antioxidační (antiradikálovou) aktivitou.

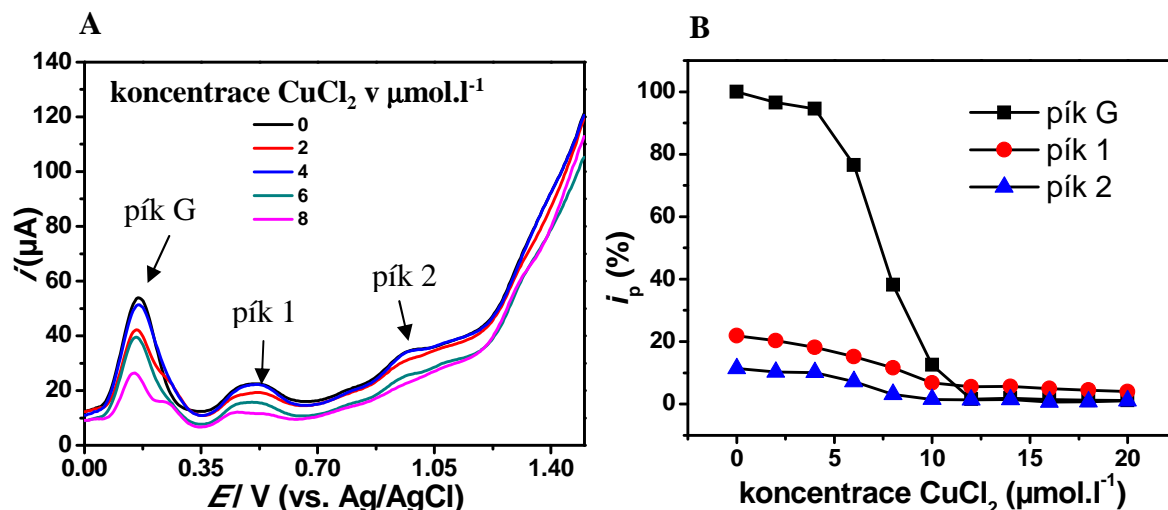


Obrázek 28. (A) DPPH, * hodnota signifikantně odlišná od troloxu ($p < 0,01$), # signifikantní rozdíly mezi 7-*O*-galloylsilybinem (7-GSB) a silybinem (SB); 100% = 50,9% inhibice a (B) chemiluminiscenční test.

5.1.4.3 Prooxidační vlastnosti

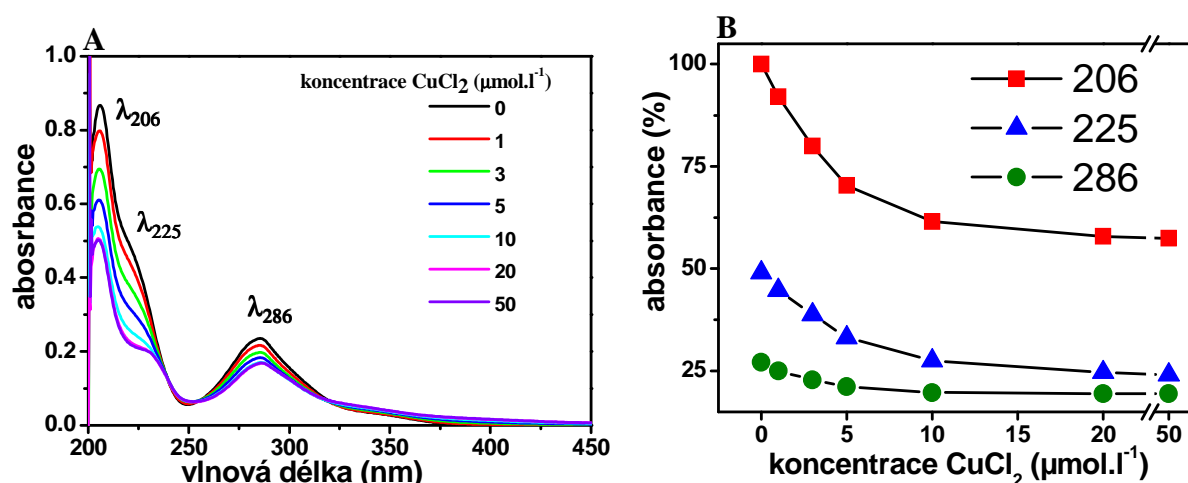
Prooxidační vlastnosti komplexů 7-*O*-galloylsilybinu a silybinu s Cu^{2+} byly studovány pomocí elektrochemických a elektroforetických metod. Komplexace Cu^{2+} se silybinem byla již popsána výše (obr. 16). Pro 7-*O*-galloylsilybin je komplexace ukázaná na obr. 29 (viz 4.3.5.1). Proudová odezva oxidačního píku G (pyrogallová skupina) a oxidačního píku 2 s rostoucí koncentrací Cu^{2+} výrazně klesla až do úplného vymizení. Naproti tomu minimální proudová odezva píku 1 byla detekovaná i po přidavku $20 \mu\text{mol.l}^{-1}$ Cu^{2+} (obr. 29).

VÝSLEDKY



Obrázek 29. (A) SW voltamogramy a (B) závislost výšky píků 7-*O*-galloylsilybinu na koncentraci Cu^{2+} ; koncentrace 7-*O*-galloylsilybinu 10 μmol.l⁻¹, 100 % = výška oxidačního pík G bez přítomnosti Cu^{2+} , základní elektrolyt fosfátový pufr (pH 7,4). SWV parametry: počáteční (0 V) a koncový (+1,4 V) potenciál, frekvence 200 Hz.

Pro ověření stechiometrického poměru komplexu 7-*O*-galloylsilybinu/Cu byla provedena UV/VIS spektroskopická analýza (viz 4.3.5.2). Absorpční spektrum 7-*O*-galloylsilybinu ukazuje dva překrývající se píky při vlnové délce 206 nm a 225 nm a jeden při 286 nm. S rostoucí koncentrací CuCl_2 klesá výška absorpčních pásů 7-*O*-galloylsilybinu (obr. 30). Uvedená interakce Cu^{2+} s 7-*O*-galloylsilybinem byla provedena v přítomnosti molekulárního kyslíku.



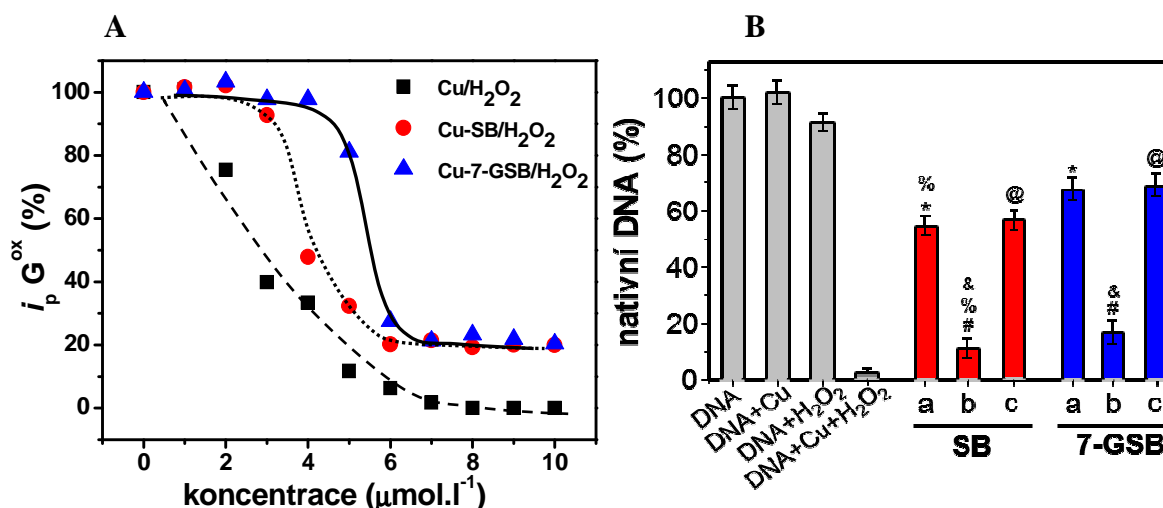
Obrázek 30. (A) Absorpční spektra a (B) závislost absorbance při vlnové délce 206, 225 a 286 nm 7-*O*-galloylsilybinu na koncentraci CuCl_2 ; koncentrace 7-*O*-galloylsilybinu

VÝSLEDKY

10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, 100 % = maximum absorpčního pásu 7-*O*-galloylsilybinu bez přítomnosti Cu^{2+} při vlnové délce 206 nm.

Studium oxidativních modifikací DNA bylo založeno na sledování oxidačních píků bází guaninu (G^{ox}) a adeninu (A^{ox}) [162]. V přítomnosti poškozujícího agens dochází k poklesu zmíněných oxidačních píků. Prooxidační vlastnosti komplexu 7-*O*-galloylsilybin/Cu byly srovnány s prooxidačními vlastnostmi komplexu silybin/Cu a Cu^{2+} v přítomnosti H_2O_2 (obr. 31A). Prooxidační vlastnosti komplexu 7-*O*-galloylsilybin/Cu byly nižší než u komplexu silybin/Cu a Cu^{2+} v přítomnosti H_2O_2 .

Prooxidační vlastnosti komplexů 7-*O*-galloylsilybin/Cu a silybin/Cu v přítomnosti H_2O_2 vůči dsDNA byly ověřeny elektroforeticky (viz 4.3.5.5) (obr. 31 B). Dále byl studován vliv telecího sérového albuminu (BSA) na poškození a fragmentaci DNA v přítomnosti komplexů flavonolignanů s Cu^{2+} ionty. V přítomnosti proteinu dochází k výraznému potlačení prooxidačních vlastností komplexů flavonolignanů s Cu^{2+} ionty vůči DNA.



Obrázek 31. (A) Závislost výšky píku G^{ox} po inkubaci oligonukleotidů s komplexem flavonolignan/kov v přítomnosti H_2O_2 . (B) Denzitometrická detekce úbytku dsDNA po inkubaci s a) komplexem flavonolignan/kov, b) komplexem flavonolignan/kov v přítomnosti H_2O_2 , c) komplexem flavonolignan/kov v přítomnosti H_2O_2 a BSA. Koncentrace flavonolignanů byla 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ a DNA 20 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (A) a 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (B), koncentrace BSA 10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, základní elektrolyt acetátový pufr (pH 5). SWV parametry: počáteční (0 V) a konečný (+1,5 V) potenciál, frekvence 200 Hz, * množství dsDNA v přítomnosti komplexu signifikantně odlišné od množství dsDNA v přítomnosti Cu^{2+} ($p < 0,01$), # množství dsDNA v přítomnosti komplexu a H_2O_2 signifikantně odlišné od množství dsDNA v přítomnosti H_2O_2 ($p < 0,01$), & množství dsDNA v přítomnosti komplexu a H_2O_2 signifikantně odlišné od

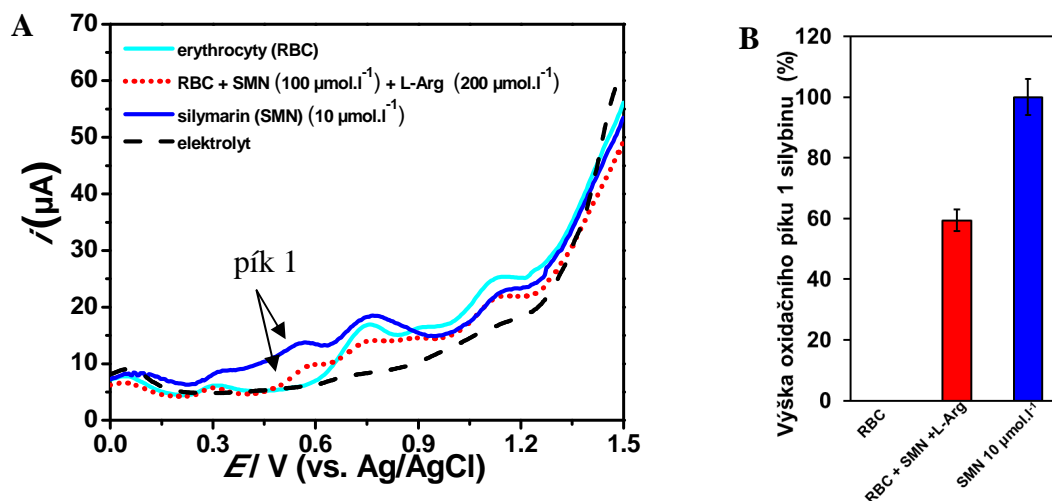
VÝSLEDKY

množství dsDNA v přítomnosti Cu^{2+} a H_2O_2 ($p < 0,01$), @ množství dsDNA v přítomnosti komplexu, H_2O_2 a BSA signifikantně odlišné od množství dsDNA v přítomnosti komplexu a H_2O_2 ($p < 0,01$), % množství dsDNA ve vzorcích a,b pro SB signifikantně odlišné od množství dsDNA ve vzorcích a,b pro 7GSB ($p < 0,01$).

5.2 Elektrochemická analýza interakcí flavonolignanů silymarinového komplexu s membránami erytrocytů a HPLC-MS analýza metabolitů 3-*O*-galloylkvercetinů a 7-*O*-galloyltaxifolinu

5.2.1 Interakce flavonolignanů silymarinového komplexu s membránami erytrocytů

Interakce silybinu, hlavní obsahové komponenty silymarinu s lidskými erytrocyty byla studována pomocí *ex situ* voltametrie (viz 4.4.1.2). Po inkubaci erytrocytů se silymarinem a následném důkladném promytí erytrocytů byla interakce hodnocena na základě pozorování prvního oxidačního píku silybinu ($E_p = +0,5$ V) po adsorpci erytrocytů na povrch PG elektrody. SW voltamogramy erytrocytů s navázaným silymarinem byly srovnány se samotnými erytrocyty, 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ silymarinem a L-argininem (obr. 32), který hraje rozhodující roli v detoxikaci amoniaku, produkci oxidu dusnatého a kreatinu [153].



Obrázek 32. (A) SWV voltamogram silymarinu (SMN) po interakci s erytrocyty (RBC), základní elektrolyt Britton-Robinsonův (pH 7,4), doba akumulace 60 s. SWV parametry: počáteční (0 V) a koncový (+1,4 V) potenciál, frekvence 200 Hz a (B) Procentuální zastoupení výšky oxidačního píku 1 silybinu v analyzovaných vzorcích, 100% = výška oxidačního píku 1 silybinu při koncentraci silymarinu 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$.

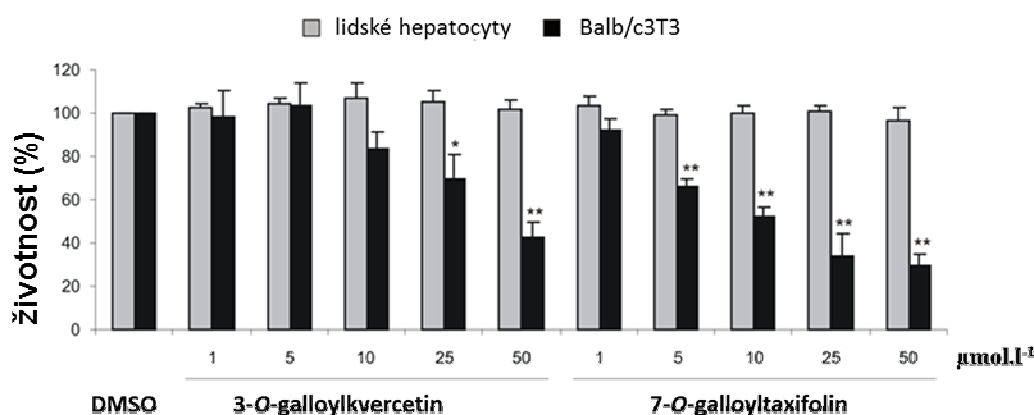
VÝSLEDKY

5.2.2 Metabolická studie 3-*O*-galloylkvercetinů a 7-*O*-galloyltaxifolinů na lidských hepatocytech

5.2.2.1 Toxicita 3-*O*-galloylkvercetinů a 7-*O*-galloyltaxifolinů na lidských hepatocytech a Balb/c 3T3

Toxicita studovaných látek byla sledována na modelu primárních kultur lidských hepatocytů izolovaných od tří multiorgánových dárců (LH42, LH44 a LH45) a na Balb/c 3T3 myších fibroblastech v koncentračním rozmezí 0 až 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ po 24 h inkubaci (obr. 33).

Vedle vizuálního hodnocení morfologických změn byla životnost buněk hodnocena MTT testem (viz 4.4.2.5). Výsledky byly vyjádřeny jako životnost buněk (%) ve srovnání s kontrolní kulturou, která byla inkubována stejnou dobu v médiu bez testovaných látek. 3-*O*-galloylkvercetin ani 7-*O*-galloyltaxifolin nebyly v testovaných koncentracích toxické na modelu lidských hepatocytů. Zatímco na Balb/c 3T3 myších fibroblastech byl pozorován toxický efekt u 3-*O*-galloylkvercetinů při koncentraci vyšší jak 25 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ a u 7-*O*-galloyltaxifolinů při koncentraci vyšší jak 5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$.



Obrázek 33. Životnost primárních lidských hepatocytů a Balb/c3T3T myších fibroblastů po aplikaci 3-*O*-galloylkvercetinů a 7-*O*-galloyltaxifolinů v koncentracích 0-50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, analyzovaných MTT testem po 24 h. Hodnoty jsou průměrem \pm SD ze tří měření. * hodnota je signifikantně odlišná od kontroly ($p < 0,05$) a ** ($p < 0,01$).

5.2.2.2 HPLC-MS 3-*O*-galloylkvercetinů-a 7-*O*-galloyltaxifolinů

3-*O*-galloylkvercetin a 7-*O*-galloyltaxifolin byly analyzovány pomocí HPLC ve spojení s ESI-QqTOF MS detektorem (viz 4.4.2.6). Retenční čas pro 3-*O*-galloylkvercetin a 7-*O*-galloyltaxifolin byl $t_R = 11,9$ min, resp. $t_R = 11,3$ min. Vzniklé metabolity analyzované v suspenzích lidských hepatocytů jsou uvedeny v tab. 4 a 5.

VÝSLEDKY

Tabulka 4. Semikvantitativní zastoupení metabolitů 3-*O*-galloylkvercetinů v lidských hepatocytech a kultivačním médiu. Vyjádřeno v %, kde součet naměřených koncentrací (3-*O*-galloylkvercetinů + vzniklých metabolitů odpovídá 100 %). Průměrné hodnoty (n = 4).

3- <i>O</i> -galloylkvercetin								
sloučenina	<i>m/z</i>	<i>t_R</i> (min)	hepatocyty			médiu		
			0 h	1 h	2 h	0 h	1 h	2 h
3- <i>O</i> -galloylkvercetin (3GQ)	453	11,9	93,6	79,8	81,0	90,3	71,9	75,9
kvercetin	301	12,7	4,2	11,3	6,3	6,9	4,6	3,6
kyselina gallová (GA)	169	1,4	2,2	2,0	1,9	2,8	10,4	8,8
glukuronid (3GQG ₁)	629	10,3	n.d.	3,2	5,5	n.d.	11,8	8,6
glukuronid (3GQG ₂)	629	10,9	n.d.	1,3	2,0	n.d.	4,6	3,2
methylderivát (3GQM ₁)	467	13,9	n.d.	2,3	3,6	n.d.	2,8	1,9
methylderivát (3GQM ₂)	467	14,6	n.d.	0,4	0,7	n.d.	n.d.	0,5

n.d. nebylo stanoveno

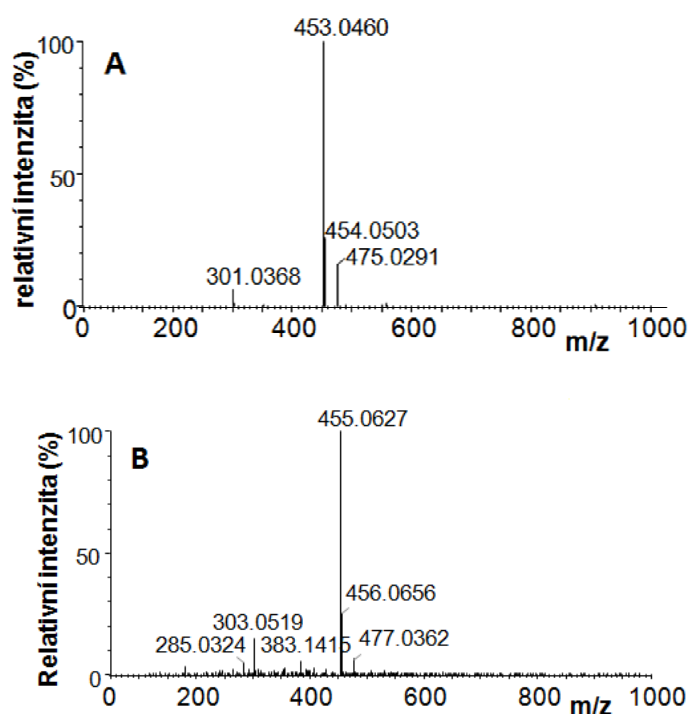
Tabulka 5. Semikvantitativní zastoupení metabolitů 7-*O*-galloyltaxifolinů v lidských hepatocytech a kultivačním médiu. Vyjádřeno v %, kde součet naměřených koncentrací (7-*O*-galloyltaxifolinů + vzniklých metabolitů odpovídá 100 %). Průměrné hodnoty (n = 4).

7- <i>O</i> -galloyltaxifolin								
sloučenina	<i>m/z</i>	<i>t_R</i> (min)	hepatocyty			médiu		
			0 h	1 h	2 h	0 h	1 h	2 h
7- <i>O</i> -galloyltaxifolin- (7GT)	455	11,3	8,4	6,3	8,1	13,7	4,3	2,9
taxifolin	303	7,3	30,6	34,4	41,4	36,7	33,5	33,8
kyselina gallová (GA)	169	1,4	28,5	28,1	20,3	44,3	47,9	44,0
taxifolin sulfát (TS)	383	7,4	4,0	22,7	24,7	n.d.	10,6	15,5
taxifolin glukuronid (TG ₁)	479	3,0	n.d.	1,0	1,7	n.d.	2,3	2,6
taxifolin glukuronid (TG ₂)	479	6,9	n.d.	2,3	2,2	n.d.	1,9	3,3
7- <i>O</i> -galloylkvercetin (7GQ)	453	15,2	10,2	1,0	1,5	1,9	0,3	0,4
kvercetin	301	12,7	18,3	5,4	2,7	3,4	1,6	1,4

n.d. nebylo stanoveno

MS spektra 3-*O*-galloylkvercetinů (*m/z* 453) a 7-*O*-galloyltaxifolinů (*m/z* 455) jsou ukázána na obr 34. MS fragmentace obou látek probíhala eliminací galloylu za vzniku fragmentů *m/z* 301 *m/z* 303.

VÝSLEDKY

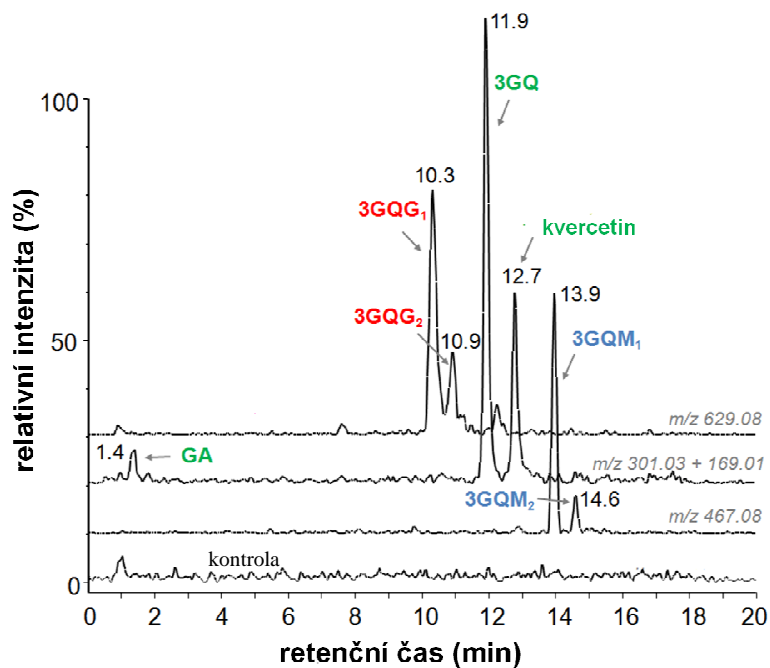


Obrázek 34. ESI/QqTOF MS spektra (A) 3-*O*-galloylquercetinu a (B) 7-*O*-galloyltaxifolinu.

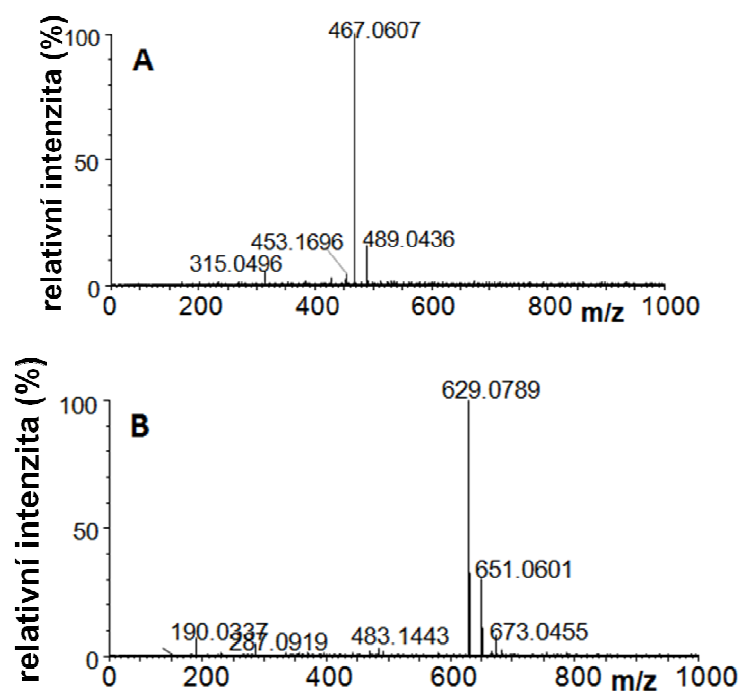
Vznik biotransformačních produktů byl pozorován po 1 h a 2 h po přidání $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ 3-*O*-galloylquercetinu a 7-*O*-galloyltaxifolinu k suspenzi lidských hepatocytů. Látky byly testovány na čtyřech různých suspenzích hepatocytů (LH42, LH44, LH45 a LH48). Po inkubaci 3-*O*-galloylquercetinu a 7-*O*-galloyltaxifolinu se suspenzí lidských hepatocytů došlo ke snížení výšky píků původních látek a tvorbě nových píků souvisejících se vznikem biotransformačních produktů.

Hlavními biotransformačními produkty 3-*O*-galloylquercetinu byly glukuronidy a methylderiváty. Pozorujeme dva píky pro každý metabolit související se vznikem různých polohových isomerů. Glukuronidy 3GQG₁ a 3GQG₂ byly identifikovány v retenčních časech 10,3 a 10,9 min a methylderiváty 3GQM₁ a 3GQM₂ v retenčních časech 13,9 a 14,6 min (obr. 35). U glukuronidů byla pozorována slabší interakce se stacionární fází než u methylderivátů. Metabolity 3-*O*-galloylquercetinu byly identifikovány na základě charakteristického posunu hmoty pro glukuronidy ($\Delta 176 m/z$) a methylderiváty ($\Delta 14 m/z$) (obr. 36).

VÝSLEDKY



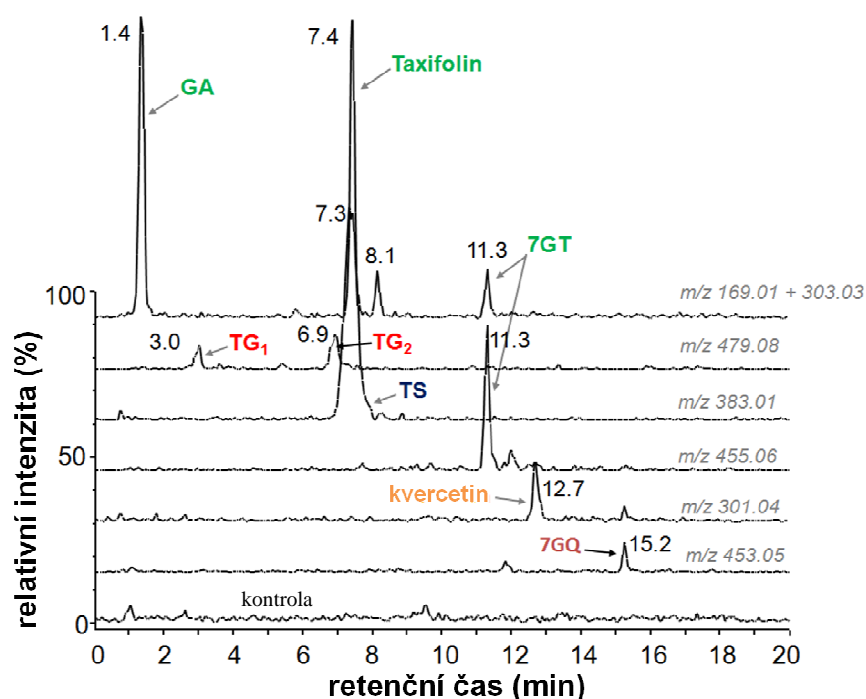
Obrázek 35. HPLC/ESI-QqTOF MS chromatogram biotransformačních produktů vzniklých po 2 h inkubaci 3-*O*-galloylkvercetinů s lidskými hepatocyty.



Obrázek 36. ESI/QqTOF MS spektra biotransformačních produktů vzniklých po 2 h inkubaci 3-*O*-galloylkvercetinů s lidskými hepatocyty (A) methylderivát a (B) glukuronid. MS spektra byla odečtena z chromatografického záznamu ukázaném na obr 35.

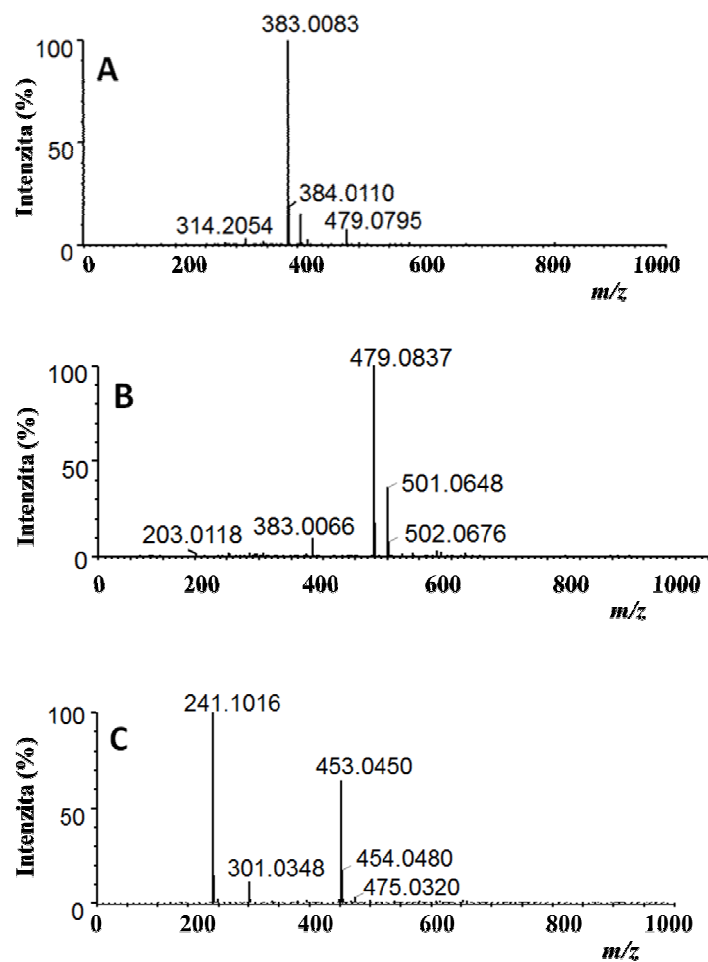
VÝSLEDKY

U 7-*O*-galloyltaxifolinu byly metabolity identifikovány po rozštěpení esterové vazby, kdy vzniká kyselina gallová a taxifolin, který je následně přeměněn na glukuronidy TG₁ a TG₂ a taxifolin sulfát TS. Retenční časy pro TG₁, TG₂ a TS byly 3,0, 6,9 a 7,4 min (obr. 37). Identifikace biotransformačních produktů byla založena na posunu hmoty $\Delta 176$ *m/z* u glukuronidů a $\Delta 60$ *m/z* u sulfátu (obr. 38). Kromě výše zmíněných produktů došlo také k oxidaci 7-*O*-galloyltaxifolinu na 7-*O*-galloylkvercetin, který poskytuje chromatografický pík s retenčním časem 15,2 min. 7-*O*-galloylkvercetin může být také štěpen za vzniku kvercetinu, $t_R = 12,7$ min.



Obrázek 37. HPLC/ESI-QqTOF MS chromatogram biotransformačních produktů vzniklých po 2 h inkubaci 7-*O*-galloyltaxifolinu s lidskými hepatocyty.

VÝSLEDKY



Obrázek 38. ESI/QqTOF MS spektra biotransformačních produktů vzniklých po 2 h inkubaci 7-*O*-galloyltaxifolinu s lidskými hepatocyty. **(A)** Taxifolin sulfát, **(B)** taxifolin glukuronid a **(C)** 7-*O*-galloylkvercetin, MS spektra byla odečtena z chromatografického záznamu ukázaném na obr 37.

6. Diskuze

Konzumace stravy bohaté na polyfenoly se obecně považuje za prospěšnou pro lidský organismus. Protektivní účinky flavonoidů jsou připisovány především jejich antioxidačním a protizánětlivým vlastnostem. Ačkoliv bylo nalezeno velké množství molekulárních cílů *in vitro* pro jednotlivé flavonoidy, jejich farmakologický potenciál je omezen, a to pravděpodobně kvůli relativně nízké biodostupnosti. Koncentrace flavonoidů v plazmě je nízká, nepřesahuje obvykle více než $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$, a to částečně i kvůli rychlému metabolismu látek tkáněmi. Díky přítomnosti reaktivních hydroxylových skupin flavonoidy prakticky nepodléhají první fázi transformace a jsou rovnou přeměněny na methylderiváty nebo konjugovány především na glukuronidy a sulfáty [24]. Pro zvýšení stability, biodostupnosti, transportu látek přes membrány buněk jsou navrhovány, syntetizovány a biologicky testovány nové deriváty přirozeně se vyskytujících polyfenolů.

V první části disertační práce byla pozornost zaměřena na elektrochemickou analýzu vybraných flavonoidů s cílem popsat mechanismus jejich oxidace, reaktivitu, antioxidační, chelatační a prooxidační vlastnosti, dále na studium interakcí flavonolignanů silymarinového komplexu s membránami erytrocytů a biotransformaci dvou nově připravených galloyl derivátů kvercetin a taxifolinu. Kvercetin a taxifolin patří mezi nejrozšířenější biologicky aktivní flavonoidy. Substituce pyrogallové skupiny může zvýšit jejich rozpustnost ve vodném prostředí, ale také ovlivnit jejich biologickou aktivitu.

6.1 *Ex situ* a *in situ* elektrochemická analýza flavonolignanů pomocí uhlíkových elektrod

Oxidace silybinu, hlavní obsahové komponenty *Silybum marianum* (ostropestřec mariánský), a jeho 2,3-dehydroderivátu (obr. 11) byla zkoumána pomocí voltametrických metod. Na základě cíleně methylovaných derivátů, 20-*O*-methylsilybinu a 7-*O*-methylsilybinu (obr. 11) bylo zjištěno, že se silybin oxiduje ve dvou stupních. První oxidační krok souvisí s oxidací hydroxylové skupiny na uhlíku C20 kruhu E a druhý oxidační krok souvisí s oxidací resorcinolové části molekuly (kruh A). U 2,3-dehydrosilybinu oxidace probíhá ve třech po sobě jdoucích krocích. Nejdříve se oxiduje hydroxylová skupina na uhlíku C3 kruhu C a dále následuje stejně jako u silybinu oxidace hydroxylových skupin na uhlíku C20 a C5/C7 (obr. 12). Je zřejmé, že dvojná vazba mezi uhlíkem C2 a C3 ovlivňuje labilitu vodíkového atomu hydroxylové skupiny na uhlíku C3, což zvyšuje schopnost této hydroxylové skupiny podléhat

DISKUZE

oxidačním dějům a následně přispívá ke zvýšení reaktivity zkoumaných molekul (obr. 39) [60, 133].

Bylo ukázáno, že 2,3-dehydrosilybin se oxiduje při výrazně nižších potenciálech a tudíž může být v porovnání se silybinem účinnějším vychytávačem volných radikálů resp. antioxidantem. Antioxidační vlastnosti flavonolignanů hodnocené na základě voltametrických metod byly následně srovnány s vybranými antioxidanty kvercetinem, rutinem, isokvercitrinem a taxifolinem. Bylo zjištěno, že flavonoly a taxifolin jsou účinnějšími antioxidanty v porovnání s flavonolignany (tab. 3).

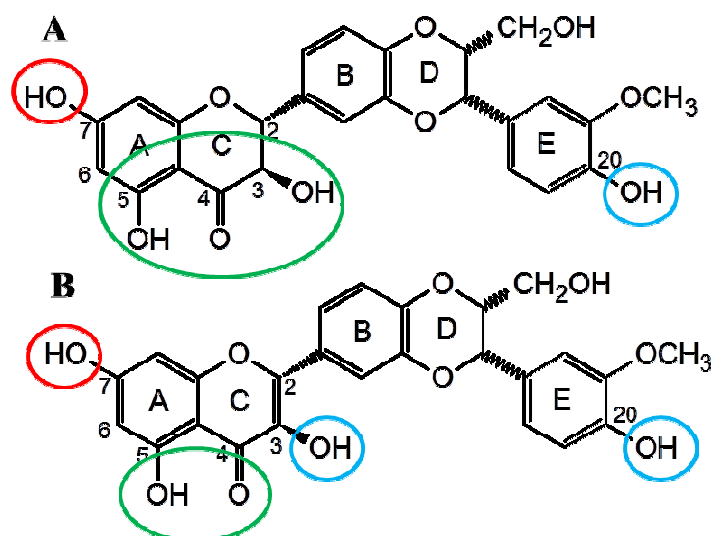
Interpretace oxidačních píků ležících při potenciálech vyšších než +1 V je komplikována v důsledku pasivace elektrody. Na základě CV experimentů můžeme usuzovat, že při vyšších potenciálech polarizace elektrody dochází pravděpodobně k tvorbě polymerního filmu, stejně jak bylo popsáno např. u 3,4-dihydroxyskořicové kyseliny [163, 164]. Z lineární závislosti velikosti proudu na rychlosti polarizace elektrody (50-2000 mV.s⁻¹) bylo zjištěno, že redoxní děje flavonolignanů jsou ovlivněny adsorpcí (obr. 14). Vliv pH základního elektrolytu na výšku a potenciál oxidačních píků byl studován v širokém rozmezí pH (2-12). S rostoucí hodnotou pH se potenciál oxidačních píků posouvá směrem k nule. Z výsledků vyplývá, že oxidace flavonolignanů souvisí s výměnou protonů a elektronů. Maximální proudová hodnota byla dosažena v neutrálním prostředí (obr. 13). Elektrochemické studie flavonoidů např. (+)-katechinu [129] potvrzují obdobné chování. S rostoucí hodnotou pH dochází k posunu potenciálu směrem k nule a ke změně velikosti anodického proudu. Výše zmíněné výsledky byly získány při plně pokrytém povrchu elektrody flavonolignany. K plnému pokrytí elektrody z pyrolytického grafitu dochází při koncentraci silybinu 10 μmol.l⁻¹ po 30 s akumulace (obr. 15). S rostoucí dobou akumulace se objevuje nový ireversibilní pík 1*, který pravděpodobně souvisí s tvorbou adsorbované vrstvy flavonolignanů na povrchu elektrody (obr. 15). Adsorpce se může využít při prekoncentračním kroku před vlastní elektrochemickou analýzou nebo při studiu interakcí flavonolignanů s biopolymery a buněčnými komponenty, jejichž množství může být limitováno. K tomuto účelu je využívána adsorpční přenosová technika.

Antioxidační kapacita polyfenolů může být ovlivněna přítomností iontů přechodných kovů reagujícími s volnými hydroxylovými skupinami polyfenolů za tvorby komplexů. Chelatace s ionty přechodných kovů byla popsána pro velké množství polyfenolů. U flavonolignanů silybinu byla popsána interakce např. s Fe³⁺ [165]. V disertační práci byla studována komplexace flavonolignanů s Ni²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺ a Zn²⁺ ionty. Po inkubaci silybinu s výše zmíněnými ionty kovů došlo k poklesu oxidačních píků silybinu. Pokles oxidačních píků

DISKUZE

souvisí s interakcí volných hydroxylových skupin flavonolignanů s ionty kovů. Chelatace byla detailně zkoumána především u Cu^{2+} iontů. Po přidavku Cu^{2+} iontů k silybinu došlo k poklesu oxidačního píku 2 a k tvorbě nového oxidačního píku (SB/Cu) (obr. 16). Cu^{2+} ionty pravděpodobně interagují s hydroxylovou skupinou na uhlíku C5 kruhu A a vedlejší oxoskupinou na kruhu C (obr. 39). Stechiometrický poměr komplexu silybin/ Cu^{2+} byl určen 2:1. Podobné chování bylo již pozorováno např. při interakci Fe^{3+} se silybinem [165] a theaflavinem [166], Cu^{2+} s kvercetinem [167, 168].

U interakcí flavonolignanů s dvouvláknovou DNA izolovanou z telecího brzlíku byla pozorovaná pouze nekovalentní interakce. Dvojná vazba u 2,3-dehydrosilybinu vede ke konformačním změnám (částečná planarita a hydrofobicita), které zvyšují afinitu k DNA. Podobně je tomu u kvercetinu (částečně planární hydrofobní systém) a taxifolinu (neplanární hydrofilní systém). Nicméně afinita kvercetinu, stejně jako 2,3-dehydrosilybinu, je značně nižší v porovnání s klasickými interkalátory (doxorubicin) [121]. Následující experimenty byly zaměřeny na studium interakcí oligonukleotidů s flavonolignany v přítomnosti iontů přechodných kovů, které vedou „primárně“ k modifikaci bází a „sekundárně“ k oxidativnímu poškození DNA volnými radikály, které můžeme pozorovat jako snížení signálů oxidačních píků guaninu a adeninu [169]. Mírné snížení signálu G^{ox} a A^{ox} bylo pozorováno při interakci samotného flavonolignanu s DNA, což pravděpodobně může být způsobeno kompeticí obou látek o povrch elektrody. Výraznější pokles byl pozorován při interakci DNA s komplexem silybinu s mědí, kdy se pravděpodobně tvoří složitější formy (adukty) [170]. Po přidavku H_2O_2 do reakční směsi dochází k postupnému snížení G^{ox} a A^{ox} píků (obr. 19). Pravděpodobně dochází ke vzniku aduktů (DNA/silybin/Cu), kde se Cu^{2+} redukuje na Cu^+ a v přítomnosti H_2O_2 a vzdušného kyslíku dojde opět k oxidaci na Cu^{2+} , přičemž vznikají reaktivní hydroxylové radikály, které způsobují fragmentaci DNA [33].

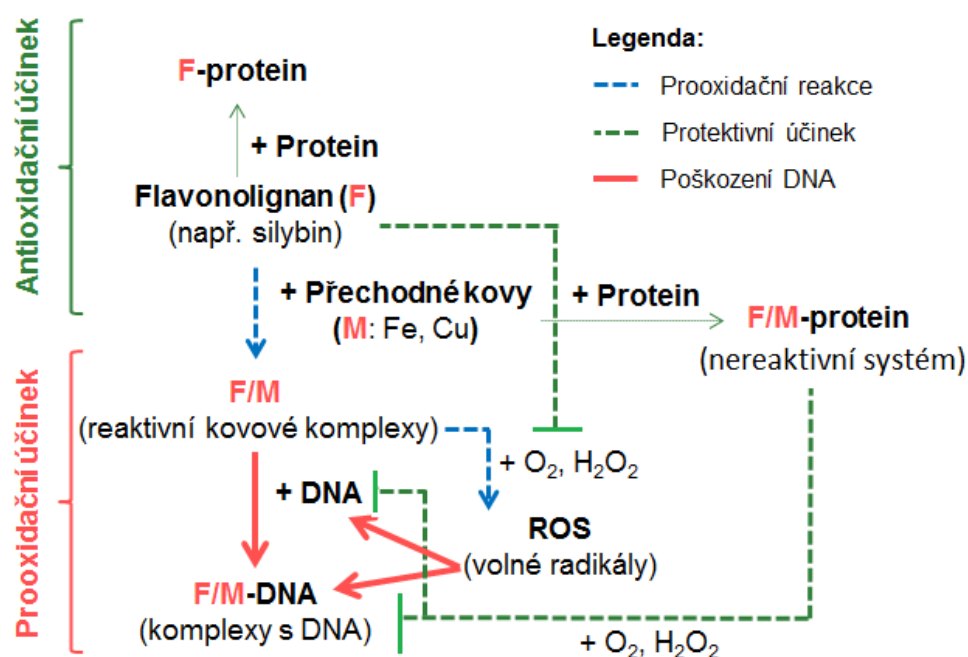


Obrázek 39. Hydroxylové skupiny (A) silybinu a (B) 2,3-dehydrosilybinu obecně zodpovědné za - prooxidační vlastnosti [171], - antioxidační vlastosti [121], - chelataci iontů kovů [121].

Na základě voltametrických analýz 3-*O*-galloylkvercetinu, 3-*O*-galloylsilybinu a 7-*O*-galloylsilybinu a jejich strukturních komponent kvercetinu, silybinu, kyseliny gallové a jejího methylesteru byl studován vliv substituce gallátem na antiradikálové, antioxidační a prooxidační vlastnosti silybinu a kvercetinu.

Ze získaných výsledků vyplývá, že u 3-*O*-galloylsilybinu a 7-*O*-galloylsilybinu došlo k výraznému zvýšení antiradikálové resp. antioxidační kapacity (obr. 21). Předpokládá se, že pyrogallová skupina u 3-*O*-galloylsilybinu a 7-*O*-galloylsilybinu se oxiduje jako první, podobně jako např. katecholová skupina u epikatechin gallátu [172]. U 3-*O*-galloylkvercetinu nemůžeme jednoznačně potvrdit, jestli se nejdříve oxiduje pyrogallová skupina nebo katecholová skupina na kruhu B. Antioxidační kapacita 7-*O*-galloylsilybinu byla dále zkoumána pomocí DPPH testu a chemiluminiscenční metodou (obr. 28). Obě tyto techniky potvrzují vyšší antiradikálové resp. antioxidační vlastnosti 7-*O*-galloylsilybinu v porovnání se silybinem. Zvýšení antiradikálové resp. antioxidační aktivity 7-*O*-galloylsilybinu je připisováno hydroxylovým skupinám pyrogallové skupiny. Kromě antioxidačních vlastností byly také srovnány prooxidační vlastnosti 7-*O*-galloylsilybinu a silybinu. Z našich výsledků vyplývá, že měďnaté ionty pravděpodobně tvoří komplexy jak mezi hydroxylovými skupinami na uhlíku C4' a C3'/C5' (struktura na obr. 26), tak mezi hydroxylovou skupinou na uhlíku C5 a oxoskupinou na uhlíku C4 (obr. 29). Za zvolených experimentálních podmínek se u silybinu hydroxylová skupina na uhlíku C20 do procesu chelatace Cu²⁺ pravděpodobně

nezapojuje. Prooxidační účinky 7-*O*-galloylsilybinu jsou signifikantně nižší než u silybinu (obr. 31), což může být spojeno s tvorbou několika komplexů s různým prooxidačním potenciálem a/nebo zablokováním hydroxylové skupiny na uhlíku C7, která může přispívat k prooxidačním vlastnostem silybinu (obr. 39) [171]. V přítomnosti telecího sérového albuminu jsou prooxidační účinky komplexu flavonolignanů s mědí vůči DNA výrazně potlačeny, což je připisováno jeho antioxidačním vlastnostem [173] a také schopnosti vázat ionty přechodných kovů [174]. Antioxidační a prooxidační vlastnosti flavonolignanů jsou schematicky ukázány na obr. 40.



Obrázek 40. Antioxidačního a prooxidačního působení studovaných flavonolignanů; F = flavonolignan, F/M = reaktivní kovové komplexy.

6.2 Elektrochemická analýza interakcí flavonolignanů silymarinového komplexu s membránami erytrocytů a HPLC-MS analýza metabolitů 3-*O*-galloylkvercetínu a 7-*O*-galloyltaxifolinu

Nedávno bylo prokázáno, že erytrocyty mohou tvořit komplexy s polyfenoly a tak se podílet na ochraně buněk proti poškození indukovaném reaktivními formami kyslíku [175]. V disertační práci bylo ukázáno, že silymarin a jeho hlavní složka silybin interaguje s membránami erytrocytů. Antioxidační kapacita vázaného silybinu byla studována pomocí *ex situ* SWV voltametrie. Pro posouzení vazby silymarinu na erytrocyty byl sledován první oxidační pík silybinu ($E_p = +0,5$ V) po adsorpci silymarinem modifikovaných erytrocytů na

DISKUZE

povrch elektrody (obr. 32). Oxidační pík souvisí s oxidací hydroxylové skupiny na uhlíku C20. Oxidační pík silybinu byl pozorován po vazbě silymarinu na erythrocyty, což znamená, že silymarinové komponenty mohou podléhat oxidaci na povrchu erythrocytů, a tak působit jako antioxidanty, a to nejen v roztoku, ale také po vazbě na membránové systémy. Po delším promývání vytvořený komplex disocioval, což se projevilo poklesem oxidačního píku silybinu. To souvisí s reverzibilní vazbou flavonoidů na buněčné membrány. Na voltamogramu (obr. 32) lze pozorovat další oxidační píky, které pravděpodobně souvisejí s oxidací ostatních komponent silymarinu (např. flavonolů), ale také s oxidací komponent buněčných membrán a širokým spektrem sloučenin navázaných na membrány erythrocytů v nativním stavu. Na základě dosažených výsledků předpokládáme, že flavonolignany silymarinového komplexu mohou interagovat s membránami erythrocytů a tím se podílet na jejich protekci před volnými radikály.

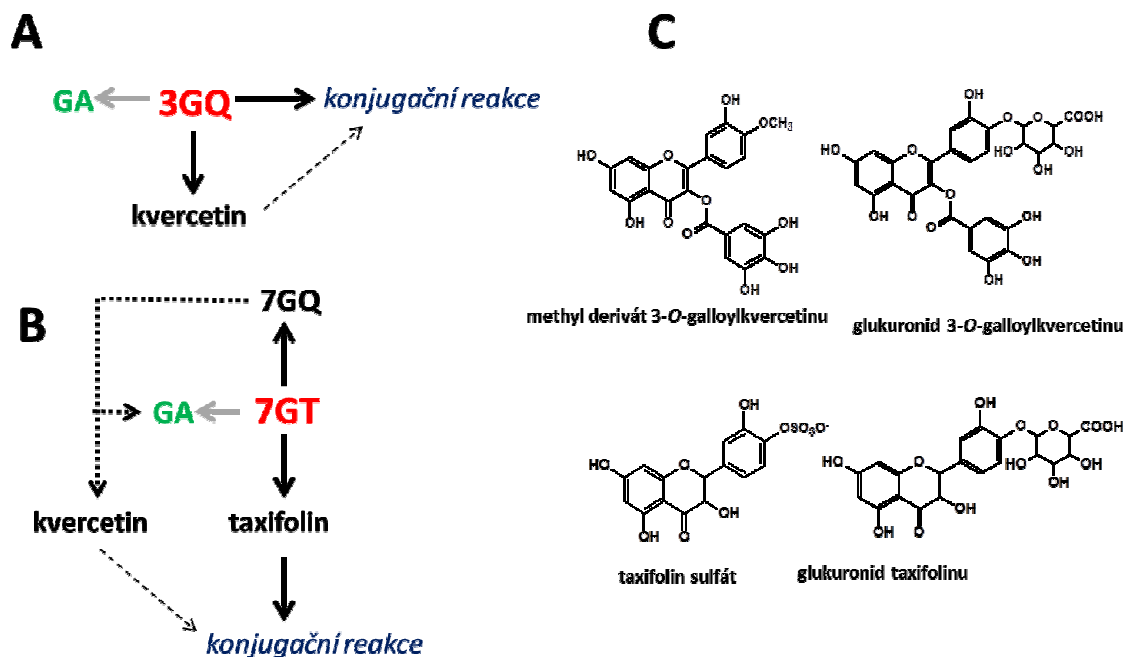
Dále byla zkoumána toxicita 3-*O*-galloylkvercetinů a 7-*O*-galloyltaxifolinů na buněčných modelech. Buněčné modely mají nezastupitelnou úlohu ve výzkumu biologické aktivity, cytotoxicity i metabolizace. Nicméně při interpretaci výsledků je také důležité brát v úvahu, že tyto modely nemohou plnit funkci kompletního organismu. Toxické působení obou látek bylo studováno na dvou buněčných modelech, lidských hepatocytech a myších fibroblastech Balb/c 3T3. K posouzení vlivu testovaných látek na životnost buněk byla použita metoda založená na redukcii tetrazoliových solí buněčnými oxidoreduktázami (MTT). Po 24 hodinové inkubaci obou látek s lidskými hepatocyty (v koncentračním rozmezí 1-50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) nedošlo k signifikantnímu ovlivnění životnosti jak u 3-*O*-galloylkvercetinů, tak u 7-*O*-galloyltaxifolinů. Naproti tomu při testování stejných koncentrací za stejných experimentálních podmínek na myších fibroblastech Balb/c 3T3 došlo k ovlivnění životnosti buněk (obr. 33). Rozdílná toxicita na izolovaných hepatocytech a metabolicky nekompetentních proliferujících buněk byla ukázána na několika *in vitro* modelech [176]. Pro následující metabolické studie s lidskými hepatocyty byla vybrána netoxická koncentrace 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ pro obě studované látky.

Hlavními biotransformačními produkty 3-*O*-galloylkvercetinů byly glukuronidy a methylderiváty, což je v souladu s výsledky biotransformačních analýz kvercetinů [177]. Semikvantitativní analýza ukázala, že biotransformace 3-*O*-galloylkvercetinů je poměrně omezena. Pouze 20 % výchozí látky bylo po 2 h inkubaci přeměněno na dané metabolity. Vznik glukuronidů 3-*O*-galloylkvercetinů byl dvakrát vyšší v porovnání s methylderiváty.

Biotransformační produkty 7-*O*-galloyltaxifolinů, glukuronidy taxifolinů a taxifolin sulfát byly identifikovány po rozštěpení esterové vazby na kyselinu gallovou a taxifolin. Dále

DISKUZE

byla pozorována oxidace 7-*O*-galloyltaxifolinu na 7-*O*-galloylkvercetin. Oxidace 7-*O*-galloyltaxifolinu a taxifolinu na 7-*O*-galloylkvercetin resp. kvercetin byla popsána také na buněčných liniích myších makrofágů RAW 264.7 [178]. Po 2 hodinové inkubaci bylo přeměněno 70 % 7-*O*-galloyltaxifolinu na výše popsané biotransformační produkty (obr. 39).



Obrázek 39. Biotransformace (A) 3-*O*-galloylkvercetinu (3GQ) a (B) 7-*O*-galloyltaxifolinu (7GT). (C) Navržené biotransformační produkty 3GQ (methylderivát a glukuronid 3-*O*-galloylkvercetinu) a 7GT (taxifolin sulfát a taxifolin glukuronid). Uveden je vždy pouze jeden z možných polohových izomerů; GA: kyselina gallová, 7GQ: 7-*O*-galloylkvercetin.

7. ZÁVĚR

Disertační práce se zabývala studiem elektrochemické oxidace vybraných flavonoidů, jejich interakcí s deoxyribonukleovými kyselinami a proteiny a biotransformací s využitím fyzikálně-chemických metod, jako je elektrochemie a hmotnostní spektrometrie. Bylo dosaženo těchto výsledků:

- Elektrochemická oxidace flavonolignanů na povrchu uhlíkových elektrod probíhá víceřadově a je závislá na pH elektrolytu.
- Silybin se oxiduje ve dvou stupních, jako první se oxiduje hydroxylová skupina na uhlíku C20 a následně resorcinolová skupina kruhu A.
- 2,3-dehydrosilybin se oxiduje ve třech krocích, jako první se oxiduje hydroxylová skupina na uhlíku C3, dále hydroxylová skupina na uhlíku C20 a resorcinolová skupina kruhu A.
- 2,3-dehydrosilybin má vyšší antiradikálovou resp. antioxidační aktivitu a je reaktivnější v porovnání se silybinem.
- Redoxní děje studovaných flavonolignanů jsou ovlivněny jejich adsorpcí.
- Hydroxylové skupiny flavonolignanů umožňují chelataci s přechodnými kovy, především Cu^{2+} .
- Substituce silybinu gallátem v pozici C7 a C3 zvyšuje antiradikálovou/antioxidační aktivitu a snižuje prooxidační vlastnosti.
- Flavonolignany interagují s DNA, komplexy flavonolignanů s mědí tvoří s DNA adukty a v přítomnosti H_2O_2 dochází k oxidativnímu poškození a fragmentaci DNA.
- Flavonolignany silymarinového komplexu interagují s membránou erytrocytů.
- Biotransformačními produkty 3-*O*-gallyolkvercetinů jsou glukuronidy a methylderiváty.
- 7-*O*-galloyltaxifolin podléhá *in vitro* hydrolýze na kyselinu gallovou a taxifolin, také se oxiduje na 7-*O*-galloylkvercetin.

Získané výsledky mohou být dále využity pro studium stability a intermolekulárních interakcí flavonoidů a obecně k dalšímu výzkumu oxidace polyfenolových látek. Výsledky předkládané v disertační práci přispívají k detailnějšímu pochopení metabolismu

ZÁVĚR

flavonolignanů a flavonolů a k specifikaci jejich molekulárních cílů. Informace o biotransformačních procesech flavonolů (galloyl derivátů) *in vitro* mohou být dále využity při identifikaci *in vivo* metabolitů a k analýze jejich biologické aktivity a toxicity.

8. SEZNAM PRACÍ VZTAHUJÍCÍCH SE K DISERTACI

Publikace:

1. Zatloukalová M., Křen V., Gažák R., Kubala M., Trouillas P., Ulrichová J., Vacek J.: Electrochemical investigation of flavonolignans and study of their interactions with DNA in the presence of Cu(II), *Bioelectrochemistry*, 82, 117–124, 2011. (IF = 3,87)
2. Zatloukalova M., Enache T. A., Kren V., Ulrichova J., Vacek J., Oliveira-Brett A. M.: Effect of 3-*O*-Galloyl Substitution on the Electrochemical Oxidation of Quercetin and Silybin Galloyl Esters at Glassy Carbon Electrode, *Electroanalysis*, 25, 1621–1627, 2013. (IF = 2,502)
3. Vacek J., Zatloukalova M., Desmier Th., Nezhodova V., Hrbac J., Kubala M., Kren V., Ulrichova J., Trouillas P.: Antioxidant, metal-binding and DNA-damaging properties of flavonolignans: A joint experimental and computational highlight based on 7-*O*-galloylsilybin, *Chem. Biol. Interact.*, 205, 173–180, 2013. (IF = 2,982)
4. Vacek J., Papouskova B., Vrba J., Zatloukalova M., Kren V., Ulrichova J.: LC –MS metabolic study on quercetin and taxifolin galloyl esters using human hepatocytes as toxicity and biotransformation in vitro cell model, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 86, 135–142, 2013. (IF = 2,829)
5. Valentova K., Vidlar A., Zatloukalova M., Stuchlik M., Vacek J., Simanek V., Ulrichova J.: Biosafety and antioxidant effects of a beverage containing silymarin and arginine. A pilot, human intervention cross-over trial, *Food Chem. Toxicol.*, 56, 178 –183, 2013. (IF = 2,61)

Prezentace na konferencích:

1. Ulrichova J., Zatloukalova M., Kren V., Vacek J.: Study of electrooxidation mechanisms and antioxidant properties of flavonols and flavonolignans. 59th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural product Research, 4.-9. 9. 2011, *Planta Med.* 77, p. 1269 (PA29), Antalya, Turecko.
2. Zatloukalová M., Křen V., Gažák R., Kubala M., Trouillas P., Ulrichová J., Vacek J.: Electrochemical investigation of flavonolignans and study of their interactions with DNA

SEZNAM PRACÍ VZTAHUJÍCÍCH SE K DISERTACI

- in the presence of Cu(II): Applications of ex situ voltammetric methods. CECE 2011 - 8th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis, 3.- 4.11.2011, ISBN 978-80-904959-0-6, p. 71, Brno, Česká republika.
3. Vacek J., Zatloukalova M., Kren V., Trouillas P., Kubala M., Ulrichova J.: Electrochemistry of 7-O-Galloylsilybin and its Antioxidant, Prooxidant and DNA-damaging Properties. 45th Heyrovsky Discussion - Electrochemistry of Biopolymers and Bioactive Compounds, 13.-17.8., O-46, Brno, Česká republika.
 4. Zatloukalova M., Nezhodova V., Ulrichova J., Kren V., Vacek J.: Aplikace magnetoseparačních technik pro izolaci poškozené DNA. 64. Sjezd asociací českých a slovenských chemických společností, 24.-27. 6. 2012, Chem. Listy 106, p. 498, Olomouc, Česká republika.
 5. Zatloukalova M., Enache T. A., Vacek J., Kren V., Brett A. M. O., Ulrichova J.: Electrooxidation Chemistry of Quercetin-3-Gallate, Bioelectrochemistry 2013. 12th Topical Meeting of the International Society of Electrochemistry & XXII International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics of the Bioelectrochemical Society, 17.-21.3.2013, Bochum, Německo.
 6. Vacek J., Papouskova B., Vrba J., Zatloukalova M., Kren V., Ulrichova J.: LC-MS metabolic study on quercetin and taxifolin galloyl esters using human hepatocytes. 7th World Congress on Polyphenols Applications, 2013, Bonn, Německo.
 7. Pyszkova M., Zatloukalova M., Biedermann D., Kren V., Ulrichova J., Ramesova S., Sokolova R., Vacek J.: Electrochemistry of Flavonolignans and their Interactions with DNA and proteins. Modern Electrochemical Methods XXXIV, 19.-23.5.2014, Jetřichovice, Česká republika.
 8. Pyszkova M., Zatloukalova M., Vavřiková E., Kalachová L., Kren V., Enache T., Pontinha D., Oliveira-Brett A. M., Vacek J.: Electrochemical Behaviour of Flavonolignan Dimers and Hybrid Molecules, 65th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, 31.8.-5.9.2014, Lausanne, Švýcarsko.

9. OSTATNÍ PRÁCE

Publikace:

1. Zatloukalova M., Orolinova E., Kubala M., Hrbac J., Vacek J.: Electrochemical Determination of Transmembrane Protein Na⁺/K⁺-ATPase and Its Cytoplasmic Loop C45, *Electroanalysis*, 24, 1758–1765, 2012. (IF = 2,502)
2. Vacek J., Zatloukalova M., Havlikova M., Ulrichova J., Kubala M.: Changes in the intrinsic electrocatalytic nature of Na⁺/K⁺ ATPase reflect structural changes on ATP-binding: Electrochemical label-free approach, *Electrochem. Commun.*, 27, 104–107, 2013. (IF = 4,287)
3. Heinrich J., Valentova K., Vacek J., Palikova I., Zatloukalova M., Kosina P., Ulrichova J., Vrbkova J., Simanek V.: Metabolic Profiling of Phenolic Acids and Oxidative Stress Markers after Consumption of *Lonicera caerulea* L. Fruit, *J. Agric. Food Chem.*, 61, 4526-4532, 2013. (IF = 3,107)
4. Kubala M., Geleticova J., Huliciak M., Zatloukalova M., Vacek J., Sebel M.: Na⁺/K⁺-ATPase inhibition by cisplatin and consequences for cisplatin nephrotoxicity, *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* 158, 194-200, 2014. (IF = 1,661)
5. Vacek J., Vrba J., Zatloukalova M., Kubala M.: Electrochemical oxidation of proteins using ionic liquids as solubilizers, adsorption solvents and electrolytes, *Electrochim. Acta* 126, 31–36, 2014. (IF = 4,086)
6. Vrba J., Papouskova B., Pyszkova M., Zatloukalova M., Lemr K., Ulrichova J., Vacek J.: Metabolism of palmatine by human hepatocytes and recombinant cytochromes P450, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 102, 193 –198, 2015. (IF = 2,829)
7. Zatloukalova M., Vacek J., Simanek V.: Electrochemical Behaviour of Alkaloids: Detection and Interaction with DNA and Proteins, *Heterocycles*, 88, 879-897, 2014. (IF = 0,908)
8. Havlikova M., Zatloukalova M., Ulrichova J., Dobes P., Vacek J.: Electrocatalytic Assay for Monitoring Methylglyoxal-Mediated Protein Glycation, *Anal. Chem.* 86, 1757-1763, 2015. (IF = 5,825)

Prezentace na konferencích:

1. Zatloukalová M., Vrublová E., Ulrichová J., Kubala M., Fojta M., Vacek J.: Electrooxidation chemistry of isoquinoline alkaloids at pyrolytic graphite. Application of ex situ voltammetry in the study of interactions of the alkaloids with DNA, XXI International Symposium on Bioelectrochemistry of Bioelectrochemical and Bioenergetics Society. 8.-12.5.2011, ISBN: 978-83-62139-23-1, p. 290. Krakov, Polsko.
2. P. Cheng, M. Zatloukalová, J. Vacek, J.-G. Zeng, V. Šimánek, M. Kubala, J. Ulrichová: Steady-state and time-resolved fluorimetric approaches in the study of interactions of isoquinoline alkaloids with biomacromolecules, CECE 2011 - 8th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis, 3.- 4.11.2011, ISBN 978-80-904959-0-6, p. 42, Brno, Česká republika..
3. Zatloukalova M., Vacek J., Ulrichova J., Simanek V.: ESI-LC-MS/MS metabolic profiling of phenolic acids in urine of human volunteers after consumption of *Lonicera caerulea* fruit. 1st European Workshop on Ambient Mass Spectrometry and Related Mass Spectrometry-based Techniques in Food/Natural Products Control: Safety, Authentication, Forensics, Metabolomics, 18.-20.6.2012, Praha, Česká republika.
4. Zatloukalova M., Orolinova E., Kubala M., Hrabac J., Vacek J.: Study of Transmembrane Protein by Label-free Electrochemistry: The Model Case of Full-length Na⁺/K⁺-ATPase and its Cytoplasmic Loop C45. 45th Heyrovsky Discussion - Electrochemistry of Biopolymers and Bioactive Compounds, 13.-17.8.2012, Brno, Česká republika.
5. Sevcikova Z., Vostalova J., Zatloukalova M., Kopecky J., Hrouzek P., Ulrichova J., Vacek J.: Cytotoxicity of cyclopentenediones on normal human dermal fibroblasts. TOXCON, 27.-31.8.2012, Slovensko.
6. Zatloukalova M., Papouskova B., Skopalova J., Vacek J.: Electrochemical Oxidation of the Isoquinoline Alkaloid Berberine in Aqueous Medium. 12th Topical Meeting of the International Society of Electrochemistry & XXII International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics of the Bioelectrochemical Society, 17.-21. 3.2013, Bochum, Německo.
7. Zatloukalova M., Modriansky M., Vacek J.: Electroanalysis of Uncoupling Protein Ucp1, Modern Electrochemical Methods XXXIV, 19.-23.5.2014, Jetřichovice, Česká republika.

OSTATNÍ PRÁCE

8. Vacek J., Vrba J., Kubala M., Zatloukalova M.: Ionic Liquids and protein Electroanalysis, Modern Electrochemical Methods XXXIV, 19.-23.5.2014, Jetřichovice, Āeská republika.
9. Zatloukalova M., Modriansky, Vacek J.: Electroanalysis of Uncoupling Protein 1 after Solubilization by Poly(Ethylene Glycol) Octyl Ether and Incorporation into Liposomes, 65th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, 31.8.-5.9.2014, Lausanne, Švýcarsko.

10. LITERATURA

1. Bravo, L. (1998) Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance, *Nutr. Rev.* 56, 317-333.
2. Wink, M. (1988) Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores, *Theor. Appl. Genet.* 75, 225-233.
3. Flora, K., Hahn, M., Rosen, H., and Benner, K. (1998) Milk Thistle (*Silybum marianum*) for the Therapy of Liver Disease, *Am. J. Gastroenterol* 93, 139-143.
4. Vita, J. A. (2005) Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function, *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 292S-297S.
5. Khan, N., Adhami, V. M., and Mukhtar, H. (2009) Review: green tea polyphenols in chemoprevention of prostate cancer: preclinical and clinical studies, *Nutr. Cancer* 61, 836-841.
6. El Gharras, H. (2009) Polyphenols: food sources, properties and applications – a review, *Int. J. Food Sci. Technol.* 44, 2512-2518.
7. Procházková, D., Boušová, I., and Wilhelmová, N. (2011) Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids, *Fitoterapia* 82, 513-523.
8. Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., and Bobilya, D. J. (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, *J. Nutr. Biochem.* 13, 572-584.
9. Parr, A. J., and Bolwell, G. P. (2000) Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile, *J. Sci. Food Agric.* 80, 985-1012.
10. Plíšková, M., Vondráček, J., Křen, V., Gažák, R., Sedmera, P., Walterová, D., Psotová, J., Šimánek, V., and Machala, M. (2005) Effects of silymarin flavonolignans and synthetic silybin derivatives on estrogen and aryl hydrocarbon receptor activation, *Toxicology* 215, 80-89.
11. Wahle, K. W. J., Brown, I., Rotondo, D., and Heys, S. D. (2010) Plant Phenolics in the Prevention and Treatment of Cancer, In *Bio-Farms for Nutraceuticals* (Giardi, M., Rea, G., and Berra, B., Eds.), pp 36-51, Springer US.
12. Sandhar, H. K., Kumar, B., Prasher, S., Tiwari, P., Salhan, M., and Sharma, P. (2011) A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids, *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 25-41.
13. Kumar, S., and Pandey, A. y. K. (2013) Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview, *The Scientific World Journal*, 1-16.
14. Pietta, P. G. (2000) Flavonoids as Antioxidants, *J. Nat. Prod.* 63, 1035-1042.
15. Salminen, J.-P., and Karonen, M. (2011) Chemical ecology of tannins and other phenolics: we need a change in approach, *Funct. Ecol.* 25, 325-338.
16. Michalak, A. (2006) Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress, *Pol. J. Environ. Stud.* 15, 523.
17. Nijveldt, R. J., van Nood, E., van Hoorn, D. E., Boelens, P. G., van Norren, K., and van Leeuwen, P. A. (2001) Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications, *Am. J. Clin. Nutr.* 74, 418-425.
18. Quiñones, M., Miguel, M., and Aleixandre, A. (2013) Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease, *Pharmacol. Res.* 68, 125-131.
19. Fotsis, T., Pepper, M. S., Aktas, E., Breit, S., Rasku, S., Adlercreutz, H., Wahala, K., Montesano, R., and Schweigerer, L. (1997) Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis, *Cancer Res.* 57, 2916-2921.

LITERATURA

20. Caltagirone, S., Rossi, C., Poggi, A., Ranelletti, F. O., Natali, P. G., Brunetti, M., Aiello, F. B., and Piantelli, M. (2000) Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential, *Int. J. Cancer* 87, 595-600.
21. Markus, M. A., and Morris, B. J. (2008) Resveratrol in prevention and treatment of common clinical conditions of aging, *Clin. Interv. Aging* 3, 331-339.
22. Rizvi, S. I., Zaid, M. A., Anis, R., and Mishra, N. (2005) Protective role of tea catechins against oxidation-induced damage of type 2 diabetic erythrocytes, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 32, 70-75.
23. Matsui, T., Ebuchi, S., Kobayashi, M., Fukui, K., Sugita, K., Terahara, N., and Matsumoto, K. (2002) Anti-hyperglycemic effect of diacylated anthocyanin derived from Ipomoea batatas cultivar Ayamurasaki can be achieved through the alpha-glucosidase inhibitory action, *J. Agric. Food Chem.* 50, 7244-7248.
24. Halliwell, B. (2008) Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies?, *Arch. Biochem. Biophys.* 476, 107-112.
25. Ratty, A. K., and Das, N. P. (1988) Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: Structure-activity relationship, *Biochemical Medicine and Metabolic Biology* 39, 69-79.
26. Vennat, B., Bos, M.-A., Pourrat, A., and Bastide, P. (1994) Procyanidins from tormentil: Fractionation and study of the anti-radical activity towards superoxide anion, *Biol. Pharm. Bull.* 17, 1613-1615.
27. Wright, J. S., Johnson, E. R., and DiLabio, G. A. (2001) Predicting the Activity of Phenolic Antioxidants: Theoretical Method, Analysis of Substituent Effects, and Application to Major Families of Antioxidants, *J. Am. Chem. Soc.* 123, 1173-1183.
28. de Heer, M. I., Mulder, P., Korth, H.-G., Ingold, K. U., and Luszyk, J. (2000) Hydrogen Atom Abstraction Kinetics from Intramolecularly Hydrogen Bonded Ubiquinol-0 and Other (Poly)methoxy Phenols, *J. Am. Chem. Soc.* 122, 2355-2360.
29. Foti, M. C., Daquino, C., and Geraci, C. (2004) Electron-Transfer Reaction of Cinnamic Acids and Their Methyl Esters with the DPPH• Radical in Alcoholic Solutions, *J. Org. Chem.* 69, 2309-2314.
30. Anouar, E., Košinová, P., Kozłowski, D., Mokrini, R., Duroux, J. L., and Trouillas, P. (2009) New aspects of the antioxidant properties of phenolic acids: a combined theoretical and experimental approach, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 11, 7659.
31. Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., and Paganga, G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radic. Biol. Med.* 20, 933-956.
32. Cook, N. C., and Samman, S. (1996) Flavonoids—Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources, *J. Nutr. Biochem.* 7, 66-76.
33. Hadi, S. M., Bhat, S. H., Azmi, A. S., Hanif, S., Shamim, U., and Ullah, M. F. (2007) Oxidative breakage of cellular DNA by plant polyphenols: a putative mechanism for anticancer properties, *Semin. Cancer Biol.* 17, 370-376.
34. Yen, G.-C., Duh, P.-D., Tsai, H.-L., and Huang, S.-L. (2003) Pro-oxidative Properties of Flavonoids in Human Lymphocytes, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 1215-1222.
35. Cao, G., Sofic, E., and Prior, R. L. (1997) Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure-Activity Relationships, *Free Radic. Biol. Med.* 22, 749-760.
36. Hanasaki, Y., Ogawa, S., and Fukui, S. (1994) The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids, *Free Radic. Biol. Med.* 16, 845-850.
37. Bayrakçeken, F., Aktaş, S., Toptan, M., and Ünlügedik, A. (2003) High resolution electronic absorption spectra of anisole and phenoxy radical, *Spectroc. Acta Pt. A-Molec. Biomolec. Spectr.* 59, 135-138.

LITERATURA

38. Awad, H. M., Boersma, M. G., Boeren, S., van Bladeren, P. J., Vervoort, J., and Rietjens, I. M. C. M. (2002) The Regioselectivity of Glutathione Adduct Formation with Flavonoid Quinone/Quinone Methides Is pH-Dependent, *Chem. Res. Toxicol.* *15*, 343-351.
39. Torres, J. L., Lozano, C., and Maher, P. (2005) Conjugation of catechins with cysteine generates antioxidant compounds with enhanced neuroprotective activity, *Phytochemistry* *66*, 2032-2037.
40. Kanakis, C. D., Tarantilis, P. A., Polissiou, M. G., Diamantoglou, S., and Tajmir-Riahi, H. A. (2005) DNA Interaction with Naturally Occurring Antioxidant Flavonoids Quercetin, Kaempferol, and Delphinidin, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* *22*, 719-724.
41. Hernández, I., Alegre, L., Van Breusegem, F., and Munné-Bosch, S. (2009) How relevant are flavonoids as antioxidants in plants?, *Trends Plant Sci.* *14*, 125-132.
42. Galati, G., Chan, T., Wu, B., and O'Brien, P. J. (1999) Glutathione-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species by the Peroxidase-Catalyzed Redox Cycling of Flavonoids, *Chem. Res. Toxicol.* *12*, 521-525.
43. Amic, D., Davidovic-Amic, D., Beslo, D., Rastija, V., Lucic, B., and Trinajstic, N. (2007) SAR and QSAR of the antioxidant activity of flavonoids, *Curr. Med. Chem.* *14*, 827-845.
44. Oliveira-Brett, A. M., and Diculescu, V. C. (2004) Electrochemical study of quercetin–DNA interactions: Part II. In situ sensing with DNA biosensors, *Bioelectrochemistry* *64*, 143-150.
45. Boath, A. S., Grussu, D., Stewart, D., and McDougall, G. J. (2012) Berry Polyphenols Inhibit Digestive Enzymes: a Source of Potential Health Benefits?, *Food Dig.* *3*, 1-7.
46. Havlik, J., de la Huebra, R. G., Hejtmankova, K., Fernandez, J., Simonova, J., Melich, M., and Rada, V. (2010) Xanthine oxidase inhibitory properties of Czech medicinal plants, *J. Ethnopharmacol.* *132*, 461-465.
47. Masuda, T., Shingai, Y., Takahashi, C., Inai, M., Miura, Y., Honda, S., and Masuda, A. (2014) Identification of a potent xanthine oxidase inhibitor from oxidation of caffeic acid, *Free Radic. Biol. Med.* *69*, 300-307.
48. Gawlik-Dziki, U. (2012) Dietary spices as a natural effectors of lipoxygenase, xanthine oxidase, peroxidase and antioxidant agents, *LWT - Food Science and Technology* *47*, 138-146.
49. Hong, J., Smith, T. J., Ho, C.-T., August, D. A., and Yang, C. S. (2001) Effects of purified green and black tea polyphenols on cyclooxygenase- and lipoxygenase-dependent metabolism of arachidonic acid in human colon mucosa and colon tumor tissues, *Biochem. Pharmacol.* *62*, 1175-1183.
50. Agrawal, A. D. (2011) Pharmacological activities of flavonoids: a review, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology* *4*.
51. Thakur, A., Vishwakarma, S., and Thakur, M. (2004) QSAR study of flavonoid derivatives as p56lck tyrosinkinase inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.* *12*, 1209-1214.
52. Ramos, S. (2007) Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention, *J. Nutr. Biochem.* *18*, 427-442.
53. Leszek, M., Joan, G., Herman, A., and Erlio, G. (1993) In vitro bioassays of non-steroidal phytoestrogens, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *45*, 399-405.
54. Herman, C., Adlercreutz, T., Goldin, B. R., Gorbach, S. L., Höckerstedt, K. A. V., Watanabe, S., Hämäläinen, E. K., Markkanen, M. H., Mäkelä, T. H., Wähälä, K. T., Hase, T. A., and Fotsis, T. (1995) Soybean Phytoestrogen Intake and Cancer Risk, *J. Nutr.* *125*, 757S-770S.

LITERATURA

55. Pathak, V., Shirota, O., Sekita, S., Hirayama, Y., Hakamata, Y., Hayashi, T., Yanagawa, T., and Satake, M. (1997) Antiandrogenic phenolic constituents from *Dalbergia cochinchinensis*, *Phytochemistry* 46, 1219-1223.
56. Jacobson, K. A., Moro, S., Manthey, J. A., West, P. L., and Ji, X. D. (2002) Interactions of flavones and other phytochemicals with adenosine receptors, *Adv. Exp. Med. Biol.* 505, 163-171.
57. Medina, J. H., Viola, H., Wolfman, C., Marder, M., Wasowski, C., Calvo, D., and Paladini, A. C. (1997) Overview-flavonoids: a new family of benzodiazepine receptor ligands, *Neurochem. Res.* 22, 419-425.
58. Jung, K. Y., Kim, D. S., Oh, S. R., Park, S. H., Lee, I. S., Lee, J. J., Shin, D. H., and Lee, H. K. (1998) Magnone A and B, novel anti-PAF tetrahydrofuran lignans from the flower buds of *Magnolia fargesii*, *J. Nat. Prod.* 61, 808-811.
59. Imai, Y., Tsukahara, S., Asada, S., and Sugimoto, Y. (2004) Phytoestrogens/flavonoids reverse breast cancer resistance protein/ABCG2-mediated multidrug resistance, *Cancer Res.* 64, 4346-4352.
60. Košinová, P., Berka, K., Wykes, M., Otyepka, M., and Trouillas, P. (2011) Positioning of Antioxidant Quercetin and Its Metabolites in Lipid Bilayer Membranes: Implication for Their Lipid-Peroxidation Inhibition, *J. Phys. Chem. B* 116, 1309-1318.
61. Kuo, S. M. (1998) Transepithelial transport and accumulation of flavone in human intestinal caco-2 cells, *Life Sci.* 63, 2323-2331.
62. Murota, K., Shimizu, S., Chujo, H., Moon, J. H., and Terao, J. (2000) Efficiency of absorption and metabolic conversion of quercetin and its glucosides in human intestinal cell line Caco-2, *Arch. Biochem. Biophys.* 384, 391-397.
63. Oitate, M., Nakaki, R., Koyabu, N., Takanaga, H., Matsuo, H., Ohtani, H., and Sawada, Y. (2001) Transcellular transport of genistein, a soybean-derived isoflavone, across human colon carcinoma cell line (Caco-2), *Biopharm. Drug Dispos.* 22, 23-29.
64. Murota, K., Shimizu, S., Miyamoto, S., Izumi, T., Obata, A., Kikuchi, M., and Terao, J. (2002) Unique uptake and transport of isoflavone aglycones by human intestinal Caco-2 cells: Comparison of isoflavonoids and flavonoids, *J. Nutr.* 132, 1956-1961.
65. Vaidyanathan, J. B., and Walle, T. (2003) Cellular Uptake and Efflux of the Tea Flavonoid (-)Epicatechin-3-gallate in the Human Intestinal Cell Line Caco-2, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 307, 745-752.
66. Peng, I.-W., and Kuo, S.-M. (2003) Flavonoid Structure Affects the Inhibition of Lipid Peroxidation in Caco-2 Intestinal Cells at Physiological Concentrations, *J. Nutr.* 133, 2184-2187.
67. Ratty, A. K., and Das, N. P. (1988) Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship, *Biochem. Med. Metab. Biol.* 39, 69-79.
68. Chaudhuri, S., Banerjee, A., Basu, K., Sengupta, B., and Sengupta, P. K. (2007) Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: Antioxidant and antihemolytic effects, *Int. J. Biol. Macromol.* 41, 42-48.
69. Kagawa, T. F., Geierstanger, B. H., Wang, A. H., and Ho, P. S. (1991) Covalent modification of guanine bases in double-stranded DNA. The 1.2-Å Z-DNA structure of d(CGCGCG) in the presence of CuCl₂, *J. Biol. Chem.* 266, 20175-20184.
70. O'Brien, N. M., Woods, J. A., Aherne, S. A., and O'Callaghan, Y. C. (2000) Cytotoxicity, genotoxicity and oxidative reactions in cell-culture models: Modulatory effects of phytochemicals, *Biochem. Soc. Trans.* 28, 22-26.
71. Boege, F., Straub, T., Kehr, A., Boesenberg, C., Christiansen, K., Andersen, A., Jakob, F., and Köhrle, J. (1996) Selected novel flavones inhibit the DNA binding or the DNA religation step of eukaryotic topoisomerase I, *J. Biol. Chem.* 271, 2262-2270.

LITERATURA

72. Austin, C. A., Patel, S., Ono, K., Nakane, H., and Fisher, L. M. (1992) Site-specific DNA cleavage by mammalian DNA topoisomerase II induced by novel flavone and catechin derivatives, *Biochem. J.* 282, 883-889.
73. Constantinou, A., Mehta, R., Runyan, C., Rao, K., Vaughan, A., and Moon, R. (1995) Flavonoids as DNA Topoisomerase Antagonists and Poisons: Structure-Activity Relationships, *J. Nat. Prod.* 58, 217-225.
74. Cho, K. H., Pezzuto, J. M., Bolton, J. L., Steele, V. E., Kelloff, G. J., Lee, S. K., and Constantinou, A. (2000) Selection of cancer chemopreventive agents based on inhibition of topoisomerase II activity, *Eur. J. Cancer* 36, 2146-2156.
75. Fang, M., Chen, D., and Yang, C. S. (2007) Dietary polyphenols may affect DNA methylation, *J. Nutr.* 137, 223S-228S.
76. Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., and Remesy, C. (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies, *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 230S-242S.
77. Asensi, M., Medina, I., Ortega, A., Carretero, J., Baño, M. C., Obrador, E., and Estrela, J. M. (2002) Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability, *Free Radic. Biol. Med.* 33, 387-398.
78. Frei, B., and Higdon, J. V. (2003) Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies, *J. Nutr.* 133, 3275S-3284S.
79. Olthof, M. R., Hollman, P. C. H., and Katan, M. B. (2001) Chlorogenic Acid and Caffeic Acid Are Absorbed in Humans, *J. Nutr.* 131, 66-71.
80. Vacek, J., Ulrichova, J., Klejduš, B., and Šimánek, V. (2010) Analytical methods and strategies in the study of plant polyphenolics in clinical samples, *Anal. Methods* 2, 604-613.
81. Wu, Y., Wang, F., Zheng, Q., Lu, L., Yao, H., Zhou, C., Wu, X., and Zhao, Y. (2006) Hepatoprotective effect of total flavonoids from *Lagdera alata* against carbon tetrachloride-induced injury in primary cultured neonatal rat hepatocytes and in rats with hepatic damage, *J. Biomed. Sci.* 13, 569-578.
82. Amat, N., Upur, H., and Blazekovic, B. (2010) In vivo hepatoprotective activity of the aqueous extract of *Artemisia absinthium* L. against chemically and immunologically induced liver injuries in mice, *J. Ethnopharmacol.* 131, 478-484.
83. Haddad, Y., Vallerand, D., Brault, A., and Haddad, P. S. (2011) Antioxidant and Hepatoprotective Effects of Silibinin in a Rat Model of Nonalcoholic Steatohepatitis, *Evid.-based Complement Altern. Med.* 2011, 10.
84. Guardia, T., Rotelli, A. E., Juarez, A. O., and Pelzer, L. E. (2001) Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat, *Il Farmaco* 56, 683-687.
85. Comalada, M., Camuesco, D., Sierra, S., Ballester, I., Xaus, J., Galvez, J., and Zarzuelo, A. (2005) In vivo quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF-kappaB pathway, *Eur. J. Immunol.* 35, 584-592.
86. Keevil, J. G., Osman, H. E., Reed, J. D., and Folts, J. D. (2000) Grape juice, but not orange juice or grapefruit juice, inhibits human platelet aggregation, *J. Nutr.* 130, 53-56.
87. Ataie, A., Sabetkasaei, M., Haghparast, A., Moghaddam, A. H., and Kazeminejad, B. (2010) Neuroprotective effects of the polyphenolic antioxidant agent, Curcumin, against homocysteine-induced cognitive impairment and oxidative stress in the rat, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 96, 378-385.
88. Aviram, M., Dornfeld, L., Rosenblat, M., Volkova, N., Kaplan, M., Coleman, R., Hayek, T., Presser, D., and Fuhrman, B. (2000) Pomegranate juice consumption

LITERATURA

- reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice, *Am. J. Clin. Nutr.* 71, 1062-1076.
89. Pandey, K. B., and Rizvi, S. I. (2009) Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease, *Oxidative Med. Cell. Longev.* 2.
 90. Heinrich, J., Valentová, K., Vacek, J., Palíková, I., Zatloukalová, M., Kosina, P., Ulrichová, J., Vrbková, J., and Šimánek, V. (2013) Metabolic Profiling of Phenolic Acids and Oxidative Stress Markers after Consumption of *Lonicera caerulea* L. Fruit, *J. Agric. Food Chem.* 61, 4526-4532.
 91. Vidlar, A., Vostalova, J., Ulrichova, J., Student, V., Krajicek, M., Vrbkova, J., and Simanek, V. (2010) The safety and efficacy of a silymarin and selenium combination in men after radical prostatectomy - a six month placebo-controlled double-blind clinical trial, *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* 154, 239-244.
 92. Hatano, T., Hori, M., Hemingway, R. W., and Yoshida, T. (2003) Size exclusion chromatographic analysis of polyphenol-serum albumin complexes, *Phytochemistry* 63, 817-823.
 93. Nozaki, A., Hori, M., Kimura, T., Ito, H., and Hatano, T. (2009) Interaction of polyphenols with proteins: binding of (-)-epigallocatechin gallate to serum albumin, estimated by induced circular dichroism, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 57, 224-228.
 94. Soares, S., Mateus, N., and Freitas, V. (2007) Interaction of different polyphenols with bovine serum albumin (BSA) and human salivary alpha-amylase (HSA) by fluorescence quenching, *J. Agric. Food. Chem.* 55, 6726-6735.
 95. Skrt, M., Benedik, E., Podlipnik, Č., and Ulrich, N. P. (2012) Interactions of different polyphenols with bovine serum albumin using fluorescence quenching and molecular docking, *Food Chem.* 135, 2418-2424.
 96. Singha Roy, A., Tripathy, D. R., Ghosh, A. K., and Dasgupta, S. (2012) An alternate mode of binding of the polyphenol quercetin with serum albumins when complexed with Cu(II), *J. Lumines.* 132, 2943-2951.
 97. Shen, F., Niu, F., Li, J., Su, Y., Liu, Y., and Yang, Y. (2014) Interactions between tea polyphenol and two kinds of typical egg white proteins—ovalbumin and lysozyme: Effect on the gastrointestinal digestion of both proteins in vitro, *Food Res. Int.* 59, 100-107.
 98. Zhu, Q., Qian, Y., Zheng, Z.-P., Lo, C., Chen, F., and Wang, M. (2013) Natural polyphenols alleviated lipid peroxidation-induced modification on BSA, *J. Funct. Food.* 5, 355-361.
 99. Perron, N. R., García, C. R., Pinzón, J. R., Chaur, M. N., and Brumaghim, J. L. (2011) Antioxidant and prooxidant effects of polyphenol compounds on copper-mediated DNA damage, *Journal of Inorganic Biochemistry* 105, 745-753.
 100. Wan, C., Cui, M., Song, F., Liu, Z., and Liu, S. (2009) A study of the non-covalent interaction between flavonoids and DNA triplexes by electrospray ionization mass spectrometry, *Int. J. Mass Spectrom.* 283, 48-55.
 101. Janjua, N. K., Siddiq, A., Yaqub, A., Sabhat, S., Qureshi, R., and Haque, S. d. u. (2009) Spectrophotometric analysis of flavonoid-DNA binding interactions at physiological conditions, *Spectroc. Acta Pt. A-Molec. Biomolec. Spectr.* 74, 1135-1137.
 102. Bi, S., Qiao, C., Song, D., Tian, Y., Gao, D., Sun, Y., and Zhang, H. (2006) Study of interactions of flavonoids with DNA using acridine orange as a fluorescence probe, *Sens. Actuator B-Chem.* 119, 199-208.

LITERATURA

103. Melidou, M., Riganakos, K., and Galaris, D. (2005) Protection against nuclear DNA damage offered by flavonoids in cells exposed to hydrogen peroxide: The role of iron chelation, *Free Radic. Biol. Med.* 39, 1591-1600.
104. Ostroumova, O. S., Chulkov, E. G., Stepanenko, O. V., and Schagina, L. V. (2014) Effect of flavonoids on the phase separation in giant unilamellar vesicles formed from binary lipid mixtures, *Chem. Phys. Lipids* 178, 77-83.
105. Tsuchiya, H. (2010) Structure-dependent membrane interaction of flavonoids associated with their bioactivity, *Food Chem.* 120, 1089-1096.
106. Abram, V., Berlec, B., Ota, A., Šentjurc, M., Blatnik, P., and Ulrih, N. P. (2013) Effect of flavonoid structure on the fluidity of model lipid membranes, *Food Chem.* 139, 804-813.
107. Ciešlik-Boczula, K., Maniewska, J., Gryniewicz, G., Szeja, W., Koll, A., and Hendrich, A. B. (2012) Interaction of quercetin, genistein and its derivatives with lipid bilayers – An ATR IR-spectroscopic study, *Vib. Spectrosc.* 62, 64-69.
108. Kahle, K., Huemmer, W., Kempf, M., Scheppach, W., Erk, T., and Richling, E. (2007) Polyphenols Are Intensively Metabolized in the Human Gastrointestinal Tract after Apple Juice Consumption, *J. Agric. Food Chem.* 55, 10605-10614.
109. Rios, L. Y., Gonthier, M. P., Remesy, C., Mila, I., Lapierre, C., Lazarus, S. A., Williamson, G., and Scalbert, A. (2003) Chocolate intake increases urinary excretion of polyphenol-derived phenolic acids in healthy human subjects, *Am. J. Clin. Nutr.* 77, 912-918.
110. Sang, S., Lee, M. J., Yang, I., Buckley, B., and Yang, C. S. (2008) Human urinary metabolite profile of tea polyphenols analyzed by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry with data-dependent acquisition, *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* 22, 1567-1578.
111. Rechner, A. R., Kuhnle, G., Hu, H., Roedig-Penman, A., van den Braak, M. H., Moore, K. P., and Rice-Evans, C. A. (2002) The metabolism of dietary polyphenols and the relevance to circulating levels of conjugated metabolites, *Free radical research* 36, 1229-1241.
112. Grun, C. H., van Dorsten, F. A., Jacobs, D. M., Le Belleguic, M., van Velzen, E. J., Bingham, M. O., Janssen, H. G., and van Duynhoven, J. P. (2008) GC-MS methods for metabolic profiling of microbial fermentation products of dietary polyphenols in human and in vitro intervention studies, *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 871, 212-219.
113. Kilmartin, P. A., and Hsu, C. F. (2003) Characterisation of polyphenols in green, oolong, and black teas, and in coffee, using cyclic voltammetry, *Food Chem.* 82, 501-512.
114. Vanickova, M., Labuda, J., Buckova, M., Surugiu, I., Mecklenburg, M., and Danielsson, B. (2000) Investigation of catechin and acridine derivatives using voltammetric and fluorimetric DNA-based sensors, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 65, 1055-1066.
115. Zhang, D., Xie, L., Jia, G., Cai, S., Ji, B., Liu, Y., Wu, W., Zhou, F., Wang, A., Chu, L., Wei, Y., Liu, J., and Gao, F. (2011) Comparative study on antioxidant capacity of flavonoids and their inhibitory effects on oleic acid-induced hepatic steatosis in vitro, *Eur. J. Med. Chem.* 46, 4548-4558.
116. Korbut, O., Bučková, M., Labuda, J., and Gründler, P. (2003) Voltammetric Detection of Antioxidative Properties of Flavonoids Using Electrically Heated DNA Modified Carbon Paste Electrode, *Sensors* 3, 1-10.
117. Zhang, D., Chu, L., Liu, Y., Wang, A., Ji, B., Wu, W., Zhou, F., Wei, Y., Cheng, Q., Cai, S., Xie, L., and Jia, G. (2011) Analysis of the Antioxidant Capacities of

LITERATURA

- Flavonoids under Different Spectrophotometric Assays Using Cyclic Voltammetry and Density Functional Theory, *J. Agric. Food Chem.* 59, 10277-10285.
118. Han, S. B., Umera, K., Han, X. Y., and Graham, J. W. (2013) Surface electrochemical oxidation and polymerization mechanism of epicatechin, *Electrochim. Acta* 90, 27-34.
 119. Markovic, Z. S., Mentus, S. V., and Markovic, J. M. D. (2009) Electrochemical and Density Functional Theory Study on the Reactivity of Fisetin and Its Radicals: Implications on in Vitro Antioxidant Activity, *J. Phys. Chem. A* 113, 14170-14179.
 120. Vestergaard, M. d., Kerman, K., and Tamiya, E. (2005) An electrochemical approach for detecting copper-chelating properties of flavonoids using disposable pencil graphite electrodes: Possible implications in copper-mediated illnesses, *Anal. Chim. Acta* 538, 273-281.
 121. Zatloukalová, M., Křen, V., Gažák, R., Kubala, M., Trouillas, P., Ulrichová, J., and Vacek, J. (2011) Electrochemical investigation of flavonolignans and study of their interactions with DNA in the presence of Cu(II), *Bioelectrochemistry* 82, 117-124.
 122. Koyama, J., Morita, I., Kobayashi, N., Konoshima, T., Takasaki, M., Osakai, T., and Tokuda, H. (2008) Correlation between oxidation potentials and inhibitory effects on Epstein-Barr virus activation of flavonoids, *Cancer Lett.* 263, 61-66.
 123. Yang, B., Arai, K., and Kusu, F. (2001) Electrochemical Behaviors of Quercetin and Kaempferol in Neutral Buffer Solution, *Anal. Sci.* 17, 987-989.
 124. Korotkova, E. I., Voronova, O. A., and Dorozhko, E. V. (2012) Study of antioxidant properties of flavonoids by voltammetry, *J. Solid State Electrochem.* 16, 2435-2440.
 125. Yang, L.-J., Tang, C., Xiong, H.-Y., Zhang, X.-H., and Wang, S.-F. (2009) Electrochemical properties of catechin at a single-walled carbon nanotubes-cetylramethylammonium bromide modified electrode, *Bioelectrochemistry* 75, 158-162.
 126. Medvidovic-Kosanovic, M., Seruga, M., Jakobek, L., and Novak, I. (2010) Electrochemical and Antioxidant Properties of (+)-Catechin, Quercetin and Rutin, *Croat. Chem. Acta* 83, 197-207.
 127. Ziyatdinova, G. K., Nizamova, A. M., Aytuganova, II, and Budnikov, H. C. (2013) Voltammetric evaluation of the antioxidant capacity of tea on electrodes modified with multi-walled carbon nanotubes, *J. Anal. Chem.* 68, 132-139.
 128. Maoela, M. S., Arotiba, O. A., Baker, P. G. L., Mabusela, W. T., Jahed, N., Songa, E. A., and Iwuoha, E. I. (2009) Electroanalytical Determination of Catechin Flavonoid in Ethyl Acetate Extracts of Medicinal Plants, *Int. J. Electrochem. Sci.* 4, 1497-1510.
 129. Janeiro, P., and Oliveira-Brett, A. M. (2004) Catechin electrochemical oxidation mechanisms, *Anal. Chim. Acta* 518, 109-115.
 130. Vasantha, V. S., and Chen, S.-M. (2006) Synergistic effect of a catechin-immobilized poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-modified electrode on electrocatalysis of NADH in the presence of ascorbic acid and uric acid, *Electrochim. Acta* 52, 665-674.
 131. Blasco, A. J., González, M. C., and Escarpa, A. (2004) Electrochemical approach for discriminating and measuring predominant flavonoids and phenolic acids using differential pulse voltammetry: Towards an electrochemical index of natural antioxidants, *Anal. Chim. Acta* 511, 71-81.
 132. Wang, M. Y., Zhang, D. E., Tong, Z. W., Xu, X. Y., and Yang, X. J. (2011) Voltammetric behavior and the determination of quercetin at a flowerlike Co₃O₄ nanoparticles modified glassy carbon electrode, *J. Appl. Electrochem.* 41, 189-196.
 133. Trouillas, P., Marsal, P., Svobodova, A., Vostalova, J., Gazak, R., Hrbac, J., Sedmera, P., Kren, V., Lazzaroni, R., Duroux, J. L., and Walterova, D. (2008) Mechanism of the antioxidant action of silybin and 2,3-dehydrosilybin flavonolignans: A joint experimental and theoretical study, *J. Phys. Chem. A* 112, 1054-1063.

LITERATURA

134. Gažák, R., Svobodová, A., Psotová, J., Sedmera, P., Přikrylová, V., Walterová, D., and Křen, V. (2004) Oxidised derivatives of silybin and their antiradical and antioxidant activity, *Bioorg. Med. Chem.* *12*, 5677-5687.
135. Ziyatdinova, G., Aytuganova, I., Nizamova, A., Morozov, M., and Budnikov, H. (2011) Cyclic voltametry of natural flavonoids on MWNT-modified electrode and their determination in pharmaceuticals, *Collect. Czech. Chem. Commun.* *76*, 1619-1631.
136. Timbola, A. K., de Souza, C. D., Giacomelli, C., and Spinelli, A. (2006) Electrochemical oxidation of quercetin in hydro-alcoholic solution, *J. Braz. Chem. Soc.* *17*, 139-148.
137. Born, M., Carrupt, P. A., Zini, R., Bree, F., Tillement, J. P., Hostettmann, K., and Testa, B. (1996) Electrochemical behaviour and antioxidant activity of some natural polyphenols, *Helv. Chim. Acta* *79*, 1147-1158.
138. Gutiérrez, F., Ortega, G., Cabrera, J. L., Rubianes, M. D., and Rivas, G. A. (2010) Quantification of Quercetin Using Glassy Carbon Electrodes Modified with Multiwalled Carbon Nanotubes Dispersed in Polyethylenimine and Polyacrylic Acid, *Electroanalysis* *22*, 2650-2657.
139. Oliveira-Brett, A. M., and Ghica, M.-E. (2003) Electrochemical Oxidation of Quercetin, *Electroanalysis* *15*, 1745-1750.
140. Simić, A., Manojlović, D., Šegan, D., and Todorović, M. (2007) Electrochemical Behavior and Antioxidant and Prooxidant Activity of Natural Phenolics, *Molecules* *12*, 2327-2340.
141. Zielinska, D., and Pierozynski, B. (2009) Electrooxidation of quercetin at glassy carbon electrode studied by a.c. impedance spectroscopy, *J. Electroanal. Chem.* *625*, 149-155.
142. Lin, X.-Q., He, J.-B., and Zha, Z.-G. (2006) Simultaneous determination of quercetin and rutin at a multi-wall carbon-nanotube paste electrodes by reversing differential pulse voltammetry, *Sens. Actuator B-Chem.* *119*, 608-614.
143. Jin, J. H., Cho, E., Kwon, C., and Jung, S. (2010) Selective Monitoring of Rutin and Quercetin based on a Novel Multi-wall Carbon Nanotube-coated Glassy Carbon Electrode Modified with Microbial Carbohydrates alpha-Cyclosophorohexadecase and Succinoglycan Monomer M3, *Bull. Korean Chem. Soc.* *31*, 1897-1901.
144. Chobot, V., Kubicova, L., Bachmann, G., and Hadacek, F. (2013) Versatile Redox Chemistry Complicates Antioxidant Capacity Assessment: Flavonoids as Milieu-Dependent Anti- and Pro-Oxidants, *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 11830-11841.
145. Jin, J. H., Kim, H., and Jung, S. (2009) Electrochemical selectivity enhancement by using monosuccinyl beta-cyclodextrin as a dopant for multi-wall carbon nanotube-modified glassy carbon electrode in simultaneous determination of quercetin and rutin, *Biotechnol. Lett.* *31*, 1739-1744.
146. Zatloukalová, M., Enache, T. A., Křen, V., Ulrichová, J., Vacek, J., and Brett, A. M. O. (2013) Effect of 3-O-Galloyl Substitution on the Electrochemical Oxidation of Quercetin and Silybin Galloyl Esters at Glassy Carbon Electrode, *Electroanalysis* *25*, 1621-1627.
147. Oliveira, A. C., and Mascaro, L. H. (2011) Evaluation of Carbon Nanotube Paste Electrode Modified With Copper Microparticles and Its Application to Determination of Quercetin, *Int. J. Electrochem. Sci.* *6*, 804-818.
148. Tesio, A. Y., Granero, A. M., Fernández, H., and Zón, M. A. (2011) Characterization of the surface redox process of adsorbed morin at glassy carbon electrodes, *Electrochim. Acta* *56*, 2321-2327.

LITERATURA

149. Wang, Y., Yao, G. J., Tang, J., Yang, C., Xu, Q., and Hu, X. Y. (2012) Online Coupling of Lab-on-Valve Format to Amperometry Based on Polyvinylpyrrolidone-Doped Carbon Paste Electrode and Its Application to the Analysis of Morin, *J. Anal. Methods Chem.* .
150. de Souza Gil, E., Enache, A. T., and Brett, A. M. O. (2012) Anodic Behaviour of Flavonoids Orientin, Eriodictyol and Robinin at a Glassy Carbon Electrode, *Electroanalysis* 24, 1576-1583.
151. Kosina, P., Kren, V., Gebhardt, R., Grambal, F., Ulrichova, J., and Walterova, D. (2002) Antioxidant properties of silybin glycosides, *Phytother. Res.* 16, S33-S39.
152. Vacek, J., Zatloukalová, M., Desmier, T., Nezhodová, V., Hrbáč, J., Kubala, M., Křen, V., Ulrichová, J., and Trouillas, P. (2013) Antioxidant, metal-binding and DNA-damaging properties of flavonolignans: A joint experimental and computational highlight based on 7-O-galloylsilybin, *Chem.-Biol. Interact.* 205, 173-180.
153. Valentová, K., Vidlář, A., Zatloukalová, M., Stuchlík, M., Vacek, J., Šimánek, V., and Ulrichová, J. (2013) Biosafety and antioxidant effects of a beverage containing silymarin and arginine. A pilot, human intervention cross-over trial, *Food Chem. Toxicol.* 56, 178-183.
154. Pichard, L., Gillet, G., Fabre, I., Dalet-Beluche, I., Bonfils, C., Thenot, J. P., and Maurel, P. (1990) Identification of the rabbit and human cytochromes P-450IIIa as the major enzymes involved in the N-demethylation of diltiazem, *Drug. Metab. Dispos* 18, 711-719.
155. Isom, H. C., Secott, T., Georgoff, I., Woodworth, C., and Mummaw, J. (1985) Maintenance of differentiated rat hepatocytes in primary culture, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 3252-3256.
156. Koren, E., Kohen, R., and Ginsburg, I. (2010) Polyphenols enhance total oxidant-scavenging capacities of human blood by binding to red blood cells, *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 235, 689-699.
157. Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžičková, V., and Koptíková, J. (2010) *Metody molekulární biologie*, Masarykova univerzita.
158. Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., and Saura-Calixto, F. (1998) A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols, *J. Sci. Food Agric.* 76, 270-276.
159. Bancirova, M. (2010) Comparison of the antioxidant capacity and the antimicrobial activity of black and green tea, *Food Res. Int.* 43, 1379-1382.
160. Sieuwerts, A. M., Klijn, J. G., Peters, H. A., and Foekens, J. A. (1995) The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50-values and cell survival, *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem* 33, 813-823.
161. Brett, C. M. A., and Oliveira-Brett, A. M. (1993) *Electrochemistry: principles, methods, and applications*, Vol. 4, Oxford university press Oxford.
162. Vacek, J., Mozga, T., Cahová, K., Pivoňková, H., and Fojta, M. (2007) Electrochemical Sensing of Chromium-Induced DNA Damage: DNA Strand Breakage by Intermediates of Chromium (VI) Electrochemical Reduction, *Electroanalysis* 19, 2093-2102.
163. da Silva, L. F., Ramos Stradiotto, N., and Oliveira, H. P. (2008) Determination of caffeic acid in red wine by voltammetric method, *Electroanalysis* 20, 1252-1258.
164. Teófilo, R. F., Kiralj, R., Ceragioli, H. J., Peterlevitz, A. C., Baranauskas, V., Kubota, L. T., and Ferreira, M. M. C. (2008) QSPR study of passivation by phenolic compounds at platinum and boron-doped diamond electrodes, *J. Electrochem. Soc.* 155, D640-D650.

LITERATURA

165. Borsari, M., Gabbi, C., Ghelfi, F., Grandi, R., Saladini, M., Severi, S., and Borella, F. (2001) Silybin, a new iron-chelating agent, *J. Inorg. Biochem.* 85, 123-129.
166. O'Coinceanainn, M., Bonnely, S., Baderschneider, B., and Hynes, M. J. (2004) Reaction of iron (III) with theaflavin: complexation and oxidative products, *J. Inorg. Biochem.* 98, 657-663.
167. Torreggiani, A., Tamba, M., Trincherò, A., and Bonora, S. (2005) Copper (II)–Quercetin complexes in aqueous solutions: spectroscopic and kinetic properties, *J. Mol. Struct.* 744, 759-766.
168. Oliveira-Brett, A. M., and Diculescu, V. C. (2004) Electrochemical study of quercetin–DNA interactions: Part I. Analysis in incubated solutions, *Bioelectrochemistry* 64, 133-141.
169. Fojta, M. (2002) Electrochemical Sensors for DNA Interactions and Damage, *Electroanalysis* 14, 1449-1463.
170. Tan, J., Wang, B., and Zhu, L. (2009) DNA binding and oxidative DNA damage induced by a quercetin copper (II) complex: potential mechanism of its antitumor properties, *J. Biol. Inorg. Chem.* 14, 727-739.
171. Gažák, R., Sedmera, P., Vrbacký, M., Vostálová, J., Drahot, Z., Marhol, P., Walterová, D., and Křen, V. (2009) Molecular mechanisms of silybin and 2, 3-dehydrosilybin antiradical activity—role of individual hydroxyl groups, *Free Radic. Biol. Med.* 46, 745-758.
172. Novak, I., Šeruga, M., and Komorsky-Lovrić, Š. (2009) Square-wave and cyclic voltammetry of epicatechin gallate on glassy carbon electrode, *J. Electroanal. Chem.* 631, 71-75.
173. Roche, M., Rondeau, P., Singh, N. R., Tarnus, E., and Bourdon, E. (2008) The antioxidant properties of serum albumin, *FEBS letters* 582, 1783-1787.
174. Bal, W., Christodoulou, J., Sadler, P. J., and Tucker, A. (1998) Multi-metal binding site of serum albumin, *J. Inorg. Biochem.* 70, 33-39.
175. Koren, E., Kohen, R., and Ginsburg, I. (2010) Polyphenols enhance total oxidant-scavenging capacities of human blood by binding to red blood cells, *Exp. Biol. Med.* 235, 689-699.
176. Vrba, J., Orolinova, E., and Ulrichova, J. (2012) Induction of heme oxygenase-1 by *Macleaya cordata* extract and its constituent sanguinarine in RAW264.7 cells, *Fitoterapia* 83, 329-335.
177. Vacek, J., Papouskova, B., Kosina, P., Vrba, J., Kren, V., and Ulrichova, J. (2012) Biotransformation of flavonols and taxifolin in hepatocyte in vitro systems as determined by liquid chromatography with various stationary phases and electrospray ionization-quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 899, 109-115.
178. Vrba, J., Gazak, R., Kuzma, M., Papouskova, B., Vacek, J., Weiszenstein, M., Kren, V., and Ulrichova, J. (2013) A novel semisynthetic flavonoid 7-O-galloyltaxifolin upregulates heme oxygenase-1 in RAW264.7 cells via MAPK/Nrf2 pathway, *J. Med. Chem.* 56, 856-866.