UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biotechnologií

Vplyv metabolizmu na biologickú aktivitu prírodných látok

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	**Bc. Frederika Mihoková**
Studijní program:	N0512A130007 Biotechnologie a genové inženýrství
Specializace:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	**doc. Mgr. Jiří Vrba, Ph.D.**
Rok:	2024

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne s vyznačením všetkých použitých prameňov a spoluautorstiev. Súhlasím zo zverejnením bakalárskej práce podľa zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, v znení neskorších predpisov. Bola som zoznámená s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, v znení neskorších predpisov.

V Olomouci dňa ....

Podpis študenta

Poďakovanie

Chcela by som sa poďakovať môjmu školiteľovi doc. Mgr. Jiřímu Vrbovi, PhD., za jeho odborné vedenie, cenné rady a pomoc pri vykonávaní experimentov v laboratóriu. Veľmi si vážim jeho ochotu a trpezlivosť, s ktorou sa mi venoval. Moja vďaka patrí aj bývalému doktorandovi Jakubovi Havláskovi, ktorý sa mi venoval pri zaúčaní metód.

V neposlednom rade by som chcela vyjadriť vďaku mojej rodine za neustálu podporu a povzbudenie pri štúdiu.

Táto práca vznikla s podporou vnútorných grantov Lekárskej fakulty Univerzity Palackého (č. IGA_LF_2023_017, IGA_LF_2024_011).

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Bc. Frederika Mihoková
Názov práce	Vplyv metabolizmu na biologickú aktivitu prírodných látok
Typ práce	Diplomová
Pracovisko	Ústav lekařské chemie a biochemie, LF UP Olomouc
Vedúci práce	doc. Mgr. Jiří Vrba, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2024

Abstrakt

Diplomová práca sa zaoberá problematikou prírodných flavonoidov, konkrétne myricetínu, naringenínu, fisetínu, hesperetínu, ampelopsínu a apigenínu, a vplyvu metabolickej sulfatácie na ich biologické účinky. V makrofágových bunkách RAW264.7 práca porovnáva cytotoxické účinky flavonoidov a ich sulfatovaných derivátov a ovplyvnenie expresie génov *Hmox1*, *Nqo1* a *Nfe2l2*, a ďalej sa zaoberá ich antiradikálovou aktivitou. Využíva biochemické metódy ako test redukcie MTT (MTT test) na zistenie viablity buniek, stanovenie mRNA pomocou kvantitatívnej real-time PCR (qPCR) a zhášanie 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazylového radikálu (DPPH). Výsledky ukázali, že sulfatácia zmierňuje cytotoxické účinky testovaných flavonoidov. V prípade fisetinu a hesperetinu sulfatácia taktiež potlačuje schopnosť flavonoidov indukovať expresiu génu *Hmox1*. Výsledky tiež ukázali, že expresia génov *Hmox1* a *Nqo1* nebola podmienená zvýšenou expresiou *Nfe2l2*. Schopnosť vychytávať radikál DPPH ukázali myricetin, fisetin a ampelopsin, avšak zo sulfatovaných flavonoidov mal antiradikálovú aktivitu iba sulfatovaný myricetin. Zo získaných výsledkov vyplýva, že sulfatácia flavonoidov znižuje ich biologické účinky a ich antiradikálovú aktivitu v chemickom systéme.

Kľúčové slová	flavonoidy, metabolizmus, biologické účinky, sulfatácia, cytotoxicita, transkripčný faktor NRF2, antioxidant, myšie makrofágy
Počet strán	55
Počet príloh	0
Jazyk	Slovenský

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Frederika Mihoková
Title	Effect of metabolism on biological activity of natural compounds
Type of thesis	Master
Department	Institute of medicinal chemistry and biochemistry, Faculty of medicine, Palacky University Olomouc
Supervisor	doc. Mgr. Jiří Vrba, Ph.D.
The year of presentation	2024

Abstract

This diploma thesis is focused on natural flavonoids, namely myricetin, naringenin, fisetin, hesperetin, ampelopsin and apigenin flavonoids, and on the effect of metabolic sulfation on their biological properties. The thesis compares cytotoxic effect of flavonoids and their sulfate derivatives and their effect on the expression of *Hmox1*, *Nqo1* and *Nfe2l2* genes in murine RAW264.7 macrophage cells, and antiradical activity of the tested compounds is also examined. Cell viability was determined by MTT assay, gene expression was evaluated by determination of mRNA using quantitative real-time PCR (qPCR), and radical scavenging activity was tested using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH). The results showed that sulfation reduces cytotoxicity of tested flavonoids. In the case of fisetin and hesperetin, sulfation also supresses the ability of flavonoids to induce *HMOX1* gene expression. Sulfated flavonoids did not affect expression of tested genes. The results also showed that the induction of *Hmox1* and *Nqo1* expression by flavonoids was not associated with increased expression of *Nfe2l2* gene. The ability to scavenge DPPH radicals was found with myricetin, fisetin and ampelopsin, but among the sulfates only sulfated myricetin showed antiradical activity. The results obtained show that sulfation of flavonoids reduces both their biological effects and their antiradical activity in the chemical system.

Keywords	Flavonoids, metabolism, biological effects, sulfation, cytotoxicity, transcriptional factor NRF2, antioxidant, mouse macrophages
Number of pages	55
Number of appendices	0
Language	Slovak

Obsah

1. ÚVOD 1
2. SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY 2
2.1 Flavonoidy a ich všeobecná charakteristika 2
2.2 Výskyt flavonoidov 4
2.3 Biosyntéza flavonoidov 6
2.3.1 Biosyntéza sulfatovaných flavonoidov 8
2.3.2 Chemická syntéza flavonoidov 9
2.4 Metabolizmus flavonoidov v ľudskom organizme 13
2.5 Biologické účinky flavonoidov 17
2.6 Transkripčný faktor NRF 2 20
3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ 22
3.1 Materiál 22
3.1.1 Chemikálie 22
3.1.2 Prístroje 22
3.1.3 Roztoky 22
3.1.4 Biologický materiál 23
3.1.5 Študované látky 23
3.1.6 Software 23
3.2 Metódy 26
3.2.1 Príprava kultivačného média 26
3.2.2 Kultivácia myších makrofágových buniek RAW264.7 26
3.2.3 Vysievanie buniek pre experimenty 26
3.2.4. Aplikácia testovaných látok k bunkám 28
3.2.5 Test cytotoxicity myších makrofágových buniek 28
3.2.6 Izolácia RNA 28
3.2.7 Reverzná transkripcia 29
3.2.7 Real-time PCR 29
3.2.8 Zhášanie DPPH radikálu 30
4 VÝSLEDKY 31
4.1 Stanovenie vplyvu flavonoidov na viabilitu buniek RAW264.7 31
4.2 Kvantitatívna PCR (qPCR) 34
4.3 Zhášanie radikálu DPPH flavonoidmi 36
5 DISKUSIA 38
6 ZÁVER 41

7 LITERATÚRA 43
8 ZOZNAM SKRATIEK 54

CIELE PRÁCE

1. Štúdium vplyvu metabolickej sulfatácie na biologickú aktivitu vybraných flavonoidov
2. Porovnanie cytotoxicity testovaných flavonoidov a ich sulfatovaných derivátov
3. Porovnanie vplyvu flavonoidov a ich sulfatovaných derivátov na dráhu transkripčného faktora NRF2

1. ÚVOD

Sekundárne metabolity rastlín patria medzi komplexné chemické zlúčeniny, ktoré sú vytvárané rastlinami v odpovedi na zmeny prostredia. Sú dôsledkom prispôsobenia organizmu či obranných mechanizmov voči patogénom alebo predátorom. Tieto látky netvoria súčasť centrálneho alebo inak povedané primárneho metabolizmu a ich biosyntéza je obmedzená na určité taxóny. Medzi sekundárne metabolity patria napríklad alkaloidy, terpenoidy, lignany a fenolické zlúčeniny medzi ktoré zaradzujeme aj flavonoidy. Sekundárny metabolizmus rastlín je veľmi rozmanitý, čo umožnilo ustavične objavovať nové prirodzene sa vyskytujúce zlúčeniny a ich deriváty. Odhadom môže z rastlinného metabolizmu pochádzať až okolo 200 000 štruktúr, z čoho veľká časť vzniká najskôr enzymatickými modifikáciami známych zlúčenín, z ktorých sa následne formujú napríklad acetylované, metylované, sulfatované, glukuronizované a glykozylované deriváty.

Táto práca sa zaoberá flavonoidmi, ktoré patria medzi bežné zložky ľudskej stravy a napriek ich nízkym dávkam sa zdajú byť prospešné pre ľudský organizmus. Biologická aktivita jednotlivých flavonoidov môže byť vo všeobecnosti ovplyvnená ich metabolickou premenou, ktorá prebieha hlavne v čreve a pečeni. Keďže flavonoidy nachádzajúce sa v potrave sú väčšinou v glykozylovanej forme, biotransformačné procesy zahŕňajú deglykosiláciu a následnú konjugáciu uvoľnených aglykónov na glukuronidy, sulfáty a metylderiváty.

Flavonoidy vo všeobecnosti disponujú veľmi prínosnými vlastnosťami pre ľudské zdravie vďaka obsahu bioaktívnych fytochemických zložiek. Môžeme medzi nich zaradiť hlavne antioxidačnú aktivitu, ochranu pred kardiovaskulárnymi ochoreniami, protizápalové či protivírusové účinky aj prevenciu voči neurodegeneratívnym chorobám. Toto biologické pôsobenie je podmienené typom flavonoidu, ich mechanizmom účinku a biologickou dostupnosťou.

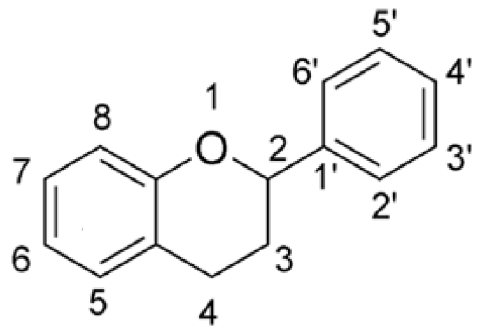
V tejto práci porovnávame účinok flavonoidov a ich sulfatovaných derivátov na myšie makrofágové bunky RAW264.7. Cieľom práce je štúdium vplyvu metabolickej sulfatácie flavonoidov a ich biologického pôsobenia. Zaoberáme sa ich cytotoxickými a antioxidačnými vlastnosťami. Hodnotíme účinky flavonoidov na expresiu *HMOX1* a *NQO1* a ich transkripčného faktora NRF2. V neposlednom rade študujeme antiradikálovú aktivitu flavonoidov prostredníctvom vychytávania radikálu DPPH.

2. SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

2.1 Flavonoidy a ich všeobecná charakteristika

Flavonoidy predstavujú najväčšiu skupinu fenolových zlúčenín medzi ktoré patria aj fenolové kyseliny, taníny, kumaríny a iné zlúčeniny (Gan *et al.*, 2019). Na základe odlišností v štruktúre (Obr. 1) ako sú zmeny na kruhu C a zmeny v pripojení kruhu B na kruh C sa flavonoidy delia na flavóny, flavonoly, izoflavóny, antokyaníny, chalkóny a ďalšie (Panche *et al.*, 2016). Vyskytujú sa vo všetkých vyšších rastlinách (Harborne *et al.*, 1988; Harborne *et al.*, 1999; Buckingham *et al.*, 2015). Sú známe svojimi priaznivými účinkami na ľudské zdravie vďaka ich charakteristickým vlastnostiam ako sú antioxidačné, antibakteriálne, antivirálne, antifugálne a protizápalové účinky. Preto nie je prekvapujúce, že výskum sa zameriava na ich biologickú aktivitu v oblasti rastlinných prírodných vied, potravinárstva či medicínskej chémie (Harborne *et al.*, 2000; Iwashina *et al.*, 2003; Bordenave *et al.*, 2014; Tungmunnithum *et al.*, 2018; Williamson *et al.*, 2018; Dias *et al.* 2021; Wang *et al.*, 2021; Sarkar *et al.*, 2022). Tieto prirodzene sa vyskytujúce zlúčeniny sú sekundárnym produktom metabolizmu v procese dlhodobej prírodnej selekcie (Wang *et al*, 2011). Ich hlavná úloha spočíva v sprostredkovaní reakcií rastlín na biologické a nebiologické faktory. Tvoria pigment plodov a kvetov rastlín, čím lákajú živočíchy a poskytujú ochranu pred biotickými stresormi ako bylinožravce, baktérie, huby a abiotickými stresormi ako je absorpcia ultrafialového žiarenia (Shen *et al.*, 2022).

Hoci sa pojem flavonoid vzťahuje na široké spektrum zlúčenín, jeho základná štruktúra je pomerne jednoduchá. Jadro štruktúry flavonoidu pozostáva z 15 atómov uhlíka v kostre C6-C3-C6 označenej uhlíkovými cyklohexamérmi A, C a B (Obr. 1). Kruh A pochádza z dráhy malenyl-koenzýmu A, kruh B z dráhy *p*-kumaroyl-koenzýmu A a kruh C vzniká cyklizáciou chalkónov (Merken *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2017). Kruh C môže mať rozdielne oxidačné stupne spolu s rozličnými substituentami v kruhoch A-C ako napríklad hydroxy-, metoxy- či glykosyloxy- , čo umožňuje existenciu rôznych flavonoidov. Na základe svojej diverzity sa flavonoidy delia do 12 skupín podľa nasledujúcich kritérií: *i*) prítomnosť/ neprítomnosť karbonylovej skupiny v polohe 4, *ii*) prítomnosť/ neprítomnosť konjugácie na C kruhu (2,3- alebo 3,4-poloha), *iii*) prítomnosť/ neprítomnosť 3-hydroxy skupiny, *iv*) umiestnenie B kruhu v polohe 2 alebo 3 (Taniguchi *et al.* 2023).



Obrázok 1: Základná štruktúra flavonoidu - kruhy zľava doprava: A, C a B. Zdroj: (Taniguchi *et al*., 2023)

2.2 Výskyt flavonoidov

V prírode sa flavonoidy nachádzajú vo forme rozličných glykozidov ako glukozidy, galaktozidy, ramnozidy alebo arabinozidy. Patria medzi najbežnejšie polyfenoly v ľudskej strave vďaka ich prítomnosti v ríši rastlín (Slámová *et al.*,2018). Flavonoidy tvoria veľkú a rozmanitú skupinu sekundárnych metabolitov prítomných v ovocí, zelenine a ďalších plodinách a aj v čaji (Panche *et al.*, 2016) V rastlinách ich nájdeme v kvetoch, listoch a semenách. Ich výskyt zaznamenávame aj v citrusoch, ktoré obsahujú flavonoidy zvyčajne vo forme glykozidov. Ako príklad môžeme uviesť flavonoidy ako naringin, eriocitrin a hesperedin, ktoré sú prítomné v pomele, citróne a pomaranči. Flavonoidy v rode citrusov predstavujú dôležité zložky regulujúce zmenu farby a vývoj chuti v ovocí a taktiež odolnosť voči stresu v rastlinách (Shen *et al.*, 2022). Vieme ich taktiež nájsť v šupkách ovocia, kde sa ich množstvo medzi jednotlivými druhmi líši, avšak medzi najviac zastúpené patria flavan-3-oly, flavonoly, antokyány a hydrochóny (Brahem *et al.*, 2017). Najvyšší podiel flavonoidov bol pozorovaný v šupkách manga, ďalej aj v šupkách ananásu a banánu (Suleria, *et al.* 2020; Čižmárová *et al.*, 2023). Počet prirodzene sa vyskytujúcich flavonoidov je veľký a neustále rastie. Od roku 2004, kedy bol ich počet okolo 9 000,vzrástol na 20 000 v roku 2015 (Williams *et al.*, 2004; Buckingham *et al.*, 2015).

Z hľadiska toho aké komplexy tvoria flavonoidy s inými zlúčeninami, vieme v prírode nájsť dva druhy flavonoidov. Jeden predstavuje aglykónové flavonoidy nachádzajúce sa v rastlinách a ten druhý vytvára zlúčeniny s cukrom, aby mohli vytvoriť glykozidy (Kim *et al.*, 2015). V rastlinách sa najčastejšie nachádzajú ako O-glykozylované deriváty, s cukrom pripojeným na hydroxylovú skupinu kruhu C v pozícií 3 a kruhu A v pozícií 5 a 7. Niektoré rastliny dokonca produkujú C-glykozylované flavonoidy, ako napríklad kukurica, pšenica, ryža (Brazier-Hicks *et al.*, 2009; Lou *et al.*, 2021).

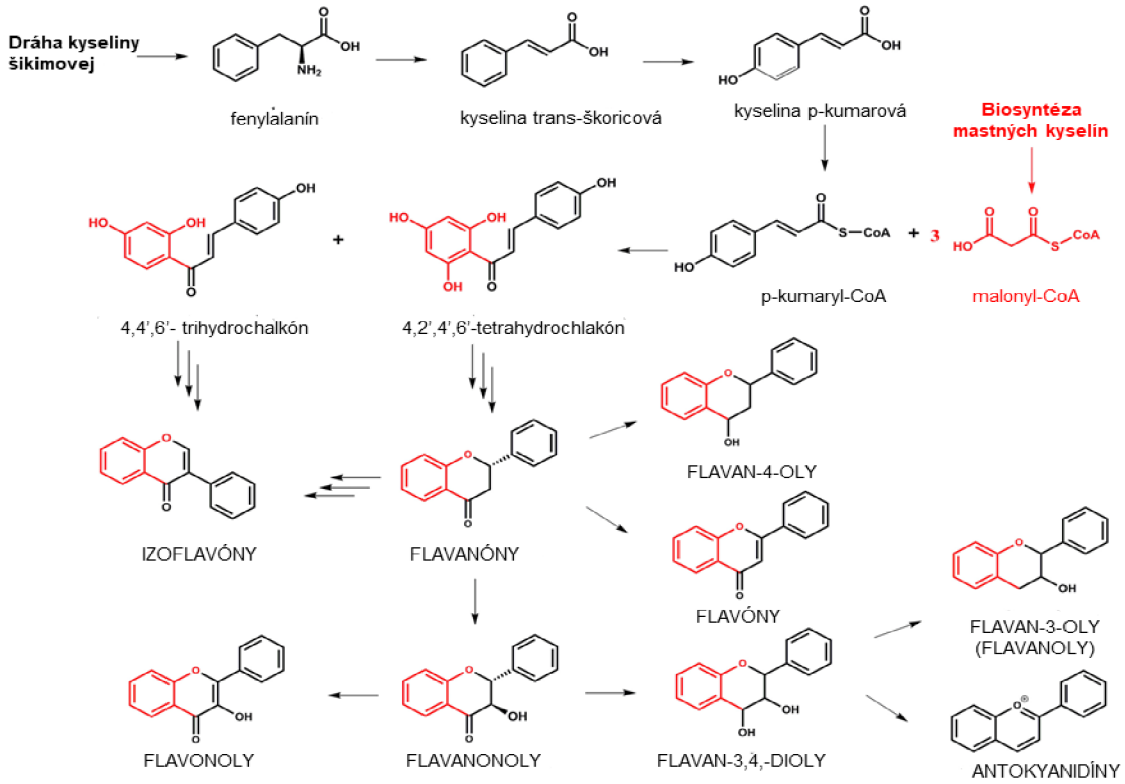
Flavonoidy sú rozmanité hlavne vďaka veľkému množstvu substituentov po obvode jadra ich štruktúry. Napríklad acatenin patrí k flavónom, ktorý obsahuje dva hydroxy-skupiny a jednu metoxy- skupinu. Acatenin, jeho glykozid a viac ako 10 ďalších flavonoidov sa nachádzajú v *Robina pseudoacacia* známom ako agát biely (Veitch *et al.*; 2010 Plaza *et al.*, 2014; Alseekh *et al.*, 2020). Absorpcia svetla u flavonoidov je na úrovni 240- 295 nm (kruh A) a >300 nm (kruh B) (Jurd *et al.*, 1962). Prvá skupina spektra flavonoidov má svetložltú až bielu farbu (Iwashina *et al.*, 2020). Hoci z antropocentrického hľadiska sa biela farba nemôže považovať za pigment, isté druhy

hmyzu dokážu vnímať vlnové dĺžky v oblasti blízko UV (Iwashina *et al.*, 2015). Zo širšieho ekologického hľadiska sa teda flavonoidy môžu považovať za prírodné pigmenty spolu s antokyanínmi, betanínmi, karotenoidmi, chlorofylmi, kurkumínmi a chinónmi (Cserhati *et al.*, 2000; Demyttenaere *et al.*, 2004).

Sulfatované flavonoidy predstavujú derivát flavonoidov, ktorý je menej častý a nájsť ho môžeme hlavne v špecifických čeľadiach rastlín (Baaron *et al.*, 1988). Môžu sa vyskytovať vo forme jednoduchých sulfátových alebo multisulfátových esterov flavonoidov, zvyčajne flavónov alebo flavonolov (Gurni *et al.*, 1981; Guglielmone *et al.*, 2005; Teles *et al.*, 2015). Prvý sulfatovaný flavonoid bol nájdený v roku 1937, konkrétne išlo o izorhamnetin-3-sulfát (perzikarin), ktorý bol izolovaný z *Polygonum hydropiper* (horčiak pieprový) (Harborne *et al.*, 1975). Neskôr sa podarilo izolovať aj ďalšie príbuzné flavonoidy, väčšinou z rastlín v močaristých oblastiach. Medzi rastlinami nachádzajúcimi sa blízko vodných oblastí bohatých na minerálne soli a biosyntézou sulfatovaných flavonoidov bola nájdená spojitosť, čo sa vyvinulo pravdepodobne na základe ekologickej adaptácie na prostredie. Odhadom môžeme povedať, že sa doteraz v prírode identifikovalo okolo 150 sulfatovaných flavonoidov, vrátane tých, ktoré majú sulfát viazaný na cukor (Bohm *et al.*, 2001). Nachádzame ich v taxóne rastlín *Angiosperm* a vyskytujú sa ako v jednokličnolistových, tak v dvojkličnolistových rastlinách. V rámci dvojkličnolistových rastlín sa v sulfatovanej forme flavonoidy vyskytujú hlavne v čeľadi astrovité, slezovité, či dilevité. Jednotlivé čeľade sú taxonomicky od seba dosť vzdialené, čo hovorí o tom, že v rámci systému sa sulfatované flavonoidy vyskytujú nezávisle na príbuznosti jednotlivých druhov. Rozšírenosť týchto derivátov však bola zaznamenaná v istých rodoch, z prieskumu viac ako 250 taxónov čeľade *Umbelliferae* (mrkvovité) sa zistilo, že sulfáty flavonoidov sú prítomné v troch rodoch a to konkrétne *Ammi* (morač), *Daucus* (mrkva) a *Oenanthe* (halucha) (Barron *et al.*, 1988; Teles *et al.*, 2015; Teles *et al.*, 2018).

2.3 Biosyntéza flavonoidov

Biosyntéza flavonoidov začína fenylalanínom, ktorý pochádza z dráhy kyseliny šikimovej. Ako vidíme na obrázku č.2., fenylalanín, ktorý je prekurzorom v syntéze flavonoidov vedie k *p*-kumaryl-CoA, a ten reaguje s troma molekulami malonyl-CoA, pochádzajúceho zo syntézy mastných kyselín, čo následne vytvorí 4,2',4',6'-tetrahydroxychalkón (naringenín chalkón) a 4,4',6'-trihydroxychalkón (izoliquiritigenín) (Dixon *et al*., 1999; Tanaka *et al*., 2008; Ashinara *et al*., 2011; Saito *et al*., 2013). Naringenín chlakón je prekurzorom na získanie flavónov, ktoré predstavujú prekurzor všetkých ostatných flavonoidov. Izoflavonoidy môžeme získať pomocou dvoch biosyntetických dráh: z 4,4',6'-trihydroxychalkónu alebo z flavonónov (Ashinara *et al*., 2011). Táto trieda zlúčenín je veľmi dôležitá, keďže flavonoidy tvoria základnú súčasť ľudskej a zvieracej stravy a disponujú aj liečebným potenciálom. Ľudia a živočíchy si totiž nedokážu nasyntetizovať flavonoidy sami, preto ich musia prijímať v potrave (Yao *et al*., 2004; Kozlowska *et al*., 2014; Raffa *et al*., 2017).



Obrázok 2: Syntéza flavonoidov. Zdroj: (Raffa *et al*., 2017)

Porozumenie syntézy flavonoidov je veľmi dôležité pokiaľ chceme rozšíriť ich zdroje a zvýšiť ich produkciu. V rastlinách prebieha ich syntéza fenylpropanoidovou dráhou (Zhang *et al.*, 2021). Prekurzory tejto dráhy sú aminokyseliny L-fenylalanín alebo L-tyrozín, zvyčajne produkované prostredníctvom dráh šikimátu a aerogenátu (Pandey *et al.*, 2016). Z glukózy, ktorá je primárnym metabolitom následne vzniká fosfoenolpyruvát a erytróza-4-fosfát glykolytickou dráhou a pentóza fosfátovou dráhou, ktoré následne spolu zreagujú, aby vytvorili kyselinu šikimovú, z ktorej následne vzniká L-fenylalanín (Pandey *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2021). Prvé tri kroky dráhy fenylpropanoidu sú katalyzované fenylalanínamoniaklyázou, 4-hydroxylázou kyseliny škoricovej a 4-kumarín-CoA ligázou (Wang *et al.*, 2011). 4-kumarín-CoA ligáza katalyzuje zmenu *p*-kumarovej kyseliny v *p*-kumaryl-CoA, ktorý predstavuje jeden z prekurzorov biosyntézy kostry C6-C3-C6 odlišných tried flavonoidov (Shah *et al.*, 2019).

Dráha konverzie L-tyrozínu je však kratšia, než použitie L-fenylalanínu ako začínajúceho substrátu. L-tyrozín totiž priamo podlieha katalýze na kyselinu *p*-kumarovú tyrozínamoniaklyázou, čím sa vyhne oxidácií kyseliny škoricovej 4-hydroxylázou kyseliny škoricovej (Shah *et al.*, 2019). Následne prebieha kondenzácia jednej molekuly *p*-kumaryl-CoA a troch molekúl malonyl-CoA, aby vytvorili naringenín chalkón. Reakcia prebieha pomocou katalýzy enzýmom chalkonsyntáza a zároveň ide o počiatočnú reakciu v tvorbe flavonoidov dráhou fenylpropanoidu. Malonyl-CoA vzniká predovšetkým z acetyl-CoA katalýzou acetyl-CoA karboxylázy (Pandey *et al.*, 2016). Kostra chalkónu je katalyzovaná rozličnými enzýmami (hydroxyláza, izomeráza, oxido-reduktáza, transferáza), čo umožňuje vytvorenie ďalších podskupín flavonoidov. Chalkóny sa vedia premeniť na flavanóny chalkonizomerázou alebo z nich môžu vzniknúť auróny, ktoré sú ďalším typom flavonoidov enzýmom rastlinnou polyfenyloxidázou (Birchfield *et al.*, 2020). Flavonóny nemusia byť len hydroxylované flavanón-3-OH transferázou za vzniku flavanonolov,ale vedia z nich vzniknúť aj flavóny, ktoré majú dvojitú väzbu medzi 2. a 3. uhlíkom kruhu C pôsobením flavónsyntázy. Z flavanonóv môžu vzniknúť aj izoflavóny predstavujúce ďalšiu skupinu flavonoidov prostredníctvom izoflavónsyntázy. Oxidáciou flavanonolov flavonolsyntázou vznikajú flavonoly, naproti tomu zas dihydroflavonol-4-reduktáza redukuje flavanonoly na flavan-3,4-dioly, inak pomenované leukoantokyanidíny (Sheng *et al.*, 2020). Napokon, flavan-3,4-dioly sa vedia transformovať na antokyanidíny antokyanidínsyntázou

a leukoantokyanidínreduktáza redukuje flavan-3,4-dioly na príslušné flavan-3-oly (Birchfield *et al.*, 2020). Tieto novovzniknuté zlúčeniny sa ďalej modifikujú na rôzne flavonoidy glykozyltransferázou, metyltransferázou, acetyltransferázou a ďalšími enzýmami (Pandey *et al.*, 2016).

Niektoré flavonoidy už boli syntenizované pomocou chemických metód, lenže tento postup si žiadal niekoľko extrémnych reakčných podmienok ako je napríklad vysoká teplota, použitie silnej kyseliny a zásady alebo použitie ťažkých kovov. Tieto podmienky taktiež nie sú šetrné voči životnému prostrediu a zabraňujú rozšíreniu tejto metódy a komerčnému využitiu. V súčasnosti je možné syntetizovať flavonoidy pomocou mikrobiálnych buniek, keďže sa začali vyvíjať nástroje pre metabolické inžinierstvo a prebiehať hĺbkové štúdie substrátov pre syntetické dráhy flavonoidov (Pandey *et al.*, 2016; Shah *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2020). Vytvorenie celej dráhy na biosyntézu flavonoidov v mikroorganizmoch poskytuje mnoho výhod ako napríklad krátky produkčný cyklus, nízku produkciu odpadov, nízku energetickú náročnosť a hromadnú výrobu. *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* a *Yarrowia lipolytica* sú vhodnými kandidátmi pre výrobu flavonoidov vďaka tomu, že rastú rýchlo a boli už viackrát použité na rozličné genetické manipulácie (Rodriguez *et al.*, 2017; Levisson *et al.*, 2018; Shrestha *et al.*, 2018; Lv *et al.*, 2019).

V roku 2003 bol v grampozitívnej vláknitej baktérií *Streptomyces coelicolor* objavený enzým 4-kumarin-CoA ligáza, ktorý nielenže aktivoval kyselinu škoricovú na cinnamoyl-CoA, ale taktiež aktivoval kyselinu 4-kumarovú na kumaroyl-CoA. Prostredníctvom využitia tohto enzýmu je možné produkovať pinocembrín chalkón z fenylalanínu fenylpropanoidovou dráhou. Prvýkrát sa syntéza flavonoidov podarila pomocou *E. coli*, do ktorej boli transformované enzýmy fenyalanínamoniaklyáza, chalkonsyntáza a 4-kumarín-CoA ligáza na produkciu naringenínu a pinocembrínu (Hwang *et al.*, 2003). Vo viacerých mikrobiálnych druhoch ako *E. coli*, *S. cerevisiae*, *Sptreptomyces albus* a *S. coelicolor* boli znovu vytvorené dráhy pre syntézu flavonoidov, konkrétne naringenínu, myricetínu, fisetínu, eriodyktiolu, antokyánov, skutelareínu a ďalších (Rodriguez *et al.*, 2017; Levisson *et al.*, 2018; Marin *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019; Dunstan *et al.*, 2020; Lou *et al.*, 2021).

2.3.1 Biosyntéza sulfatovaných flavonoidov

Sulfatované flavonoidy obsahujú síru, ktorá je veľmi dôležitým výživným prvkom pre rast zeleniny a väčšinou ju vieme nájsť v niektorých organických zlúčeninách, z aminokyselín napríklad v cysteíne a metioníne, a ďalej v proteínoch, koenzýmoch

a vitamínoch (Gigolashvili & Kopriva, 2014). Rastliny väčšinou získavajú síru vo forme síranov z pôdy. Ich množstvo v pôde je však nízke a preto je na správnu absorpciu potrebná účasť aktívnych transportérov v koreňoch, floéme, tonoplaste a plastide, aby sa zaručil rovnomerný príjem a distribúcia síry. Transportéry sú teda pre zachovanie homestázy síry a jej derivátov veľmi dôležité (Hell, 1997; Gigolashvili & Kopriva, 2014; Enerstvedt *et al.*, 2016). Po prijatí sulfátov z pôdy, ATP-sulfuryláza katalyzuje ich asimiláciu na adenozín-5'-fosfosulfát. Ten môže byť fosforylovaný na 3'-fosfoadenozín-5'-fosfosulfát (PAPS), ktorý sa zúčastňuje sulfatačných rekcií sekundárneho metabolizmu (Hell, 1997; Davidian & Kopriva, 2010). PAPS sa produkuje v plastidoch s následným exportom do cytoplazmy. Sulfotransferázy pochádzajúce z cytosolu (SOT) majú schopnosť katalyzovať produkciu sulfatovaných flavonoidov, ktoré vznikajú z hydroxylovaných substrátov a iných sulfatovaných sekundárnych metabolitov pochádzajúcich zo sulfátu PAPS (Harborne, 1975). V Golgiho aparáte vieme nájsť ďalšie izoformy SOT, kde ich funkcia spočíva v adícií sulfátu na proteíny a sacharidy, ktoré následne putujú z bunky (De Graffenried & Bertozzi, 2003). Tieto enzýmy dokonca pravdepodobne majú funkciu pri určovaní pozície sulfátovej skupiny u flavonoidov, keďže rozličné druhy cytosolických sulfotransferáz vykazujú voči istým hydroxylovým polohám a aglykónom špecifickosť. Môžeme to uviesť na príklade flavonolových sulfotransferáz rastliny *Arabidopsis thaliana*, ktorá má lepšiu afinitu s kaempferolom alebo s flavonolovými glykozidmi, tým že sulfátovú skupinu premiestni na hydroxyl v 3. alebo 7. pozícií (Hirschmann *et al.*, 2014; Cassidy & Mnihane, 2017).

2.3.2 Chemická syntéza flavonoidov

Pre výskum sulfatovaných flavonoidov sa môžu tieto látky pripravovať pomocou chemických či chemoenzymatických metód. Takýmto syntetizovaním vieme cieľové sírany získať vo forme sodných, draselných či trialkylamónnych solí. Problémom v tejto syntéze však je, že môže dochádzať k potenciálnej kontaminácií s anorganickými soľami. Ich detekcia a odstránenie sú náročné kvôli dobrej rozpustnosti sulfátov vo vode, čim vedia význame narušiť biologické alebo iné testy (AI-Horani & Desai, 2010). Pre purifikáciu cieľových síranov sa používa chromatografia na silica géle, ktorá však nie je príliš efektívna, pretože požadované produkty majú vysokú polaritu. Identifikovať nami požadované sulfáty vie byť taktiež dosť komplikované, pretože detegovať prítomnosť sulfátu na pôvodnej hydroxy skupine zvyčajnými metódami nukleárnej magnetickej rezonancie (NMR) nevieme. Na potvrdenie štruktúry sa vyžaduje

kombinácia niekoľkých analýz ako napríklad hmotnostnej spektrometrie, porovnania NMR so spektrom východiskového materiálu či derivatizácie-metylácie. Pre príklad je možné uviesť prípravu sulfatované flavonoidu luteolínu, kde ale nebol uvedený výťažok a pravdepodobne nebolo možné presne určiť polohu sulfátu (Hayasaka *et al.*, 2018).

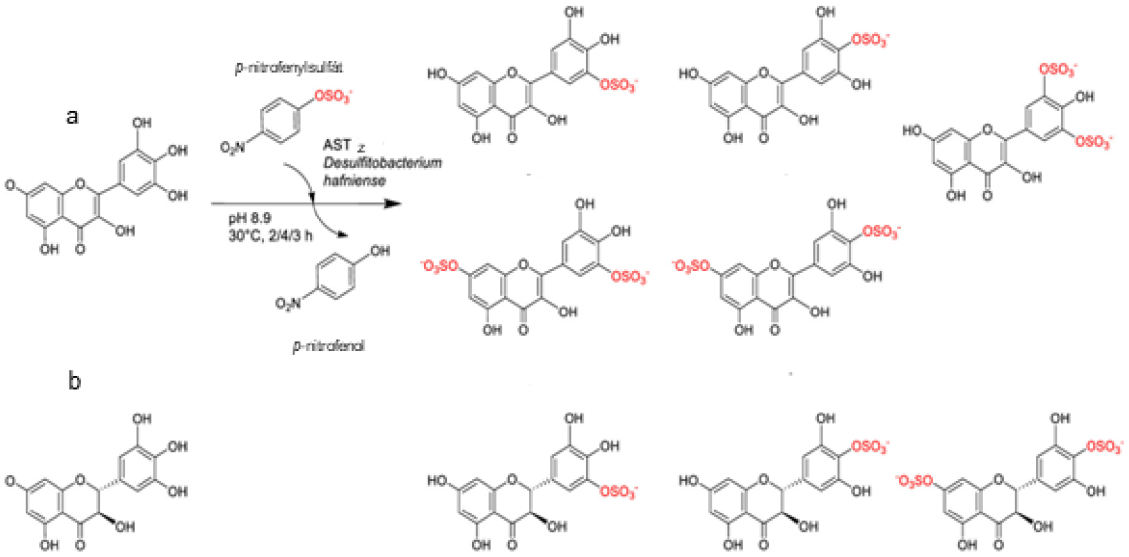
Vrámci chemickej syntézy sulfátov fenolov sa často používajú komplexy SO_3 s dusíkovou bázou. V minulosti sa pri sulfatácií rôznych fenolov používal SO_3-pyridínový komplex (Gomes *et al.*, 2015; Filipa Almeida *et al.*, 2017). Ďalší z komplexov, SO_3-*N*-trietylamínový komplex sa použil pri príprave viacerých sulfátov kvercetínu (Duenas *et al.*, 2012). V poslednom čase sa vyvinula metóda, pri ktorej sa na výrobu sulfátu 4-metoxyfenyla sodného využíva komplex SO_3-*N*-tributylamínu, ktorá umožňuje jednoduchšiu purifikáciu na základe toho, že medziprodukty síranu tributylamonného sa rozpúšťajú v organických rozpúšťadlách (Gill *et al.*, 2019). K ďalším komplexom, ktoré sa využili pri syntetizovaní sulfátov patria SO_3-*N*-trimetylamínový komplex a SO_3-dimetylformamidový komplex (Needs & Kroon, 2006; Raghuraman *et al.*, 2007). Chemická syntéza sulfatovaných flavonoidov však okrem toho, že je časovo náročná, tak si často vyžaduje nutnosť použitia toxických chemikálií a rozpúšťadiel, následkom čoho sa vytvára komplexná zmes izomérov, náročná na separáciu (Simpson & Widlanski, 2006; Dueñas *et al.*, 2012).

Okrem komplexov SO_3 sa ako ďalšia alternatíva využíva kyselina chlórsulfónová, a to najmä pri príprave rozličných fenylsulfátov, ako aj sulfátu kyseliny *p*-kumarovej a sulfatovaných flavonoidov (Todd *et al.*, 1993; Soidinsalo & Wähälä, 2007). Pozmenená verzia tejto metódy sa snaží využiť estery kyseliny chlórsulfónovej ako 2,2,2-trichlór ester kyseliny chlórsulfonovej alebo imidazolové soli sulfurylu, kedy reakcia môže prebiehať pri miernejších podmienkach, ale následne je potrebné odstrániť sulfátovú skupinu (Liu *et al.*, 2003; Taylor & Desoky, 2011; Zhang *et al.*, 2012). Ako ďalší typ reakcie, pri ktorej vznikajú diestery kyseliny sírovej je výmena fluoridov síry, pri ktorej arylsulfáty reagujú so silyl éterami. Vzniknuté diestery kyseliny sírovej sa ďalej redukujú hydrogenolýzou na požadované sulfáty (Liu *et al.*, 2020).

Ako druhá možnosť syntézy sulfatovaných fenolov sa využívajú enzymatické reakcie, ktoré bývajú naproti chemickým činidlám omnoho viac selektívne. Hlavne v posledných dvoch desaťročiach sa v tejto oblasti podstatne pokročilo. Do sulfatácie pomocou enzýmov sa v prírodných podmienkach obvykle zapájajú sulfotransferázy, kedy ako donor sulfátu pôsobí fosfoadenozín-5'-fosfosulfát (PAPS). Tento substrát je však príliš labilný, a preto preparatívna sulfatácia tak nie je vhodná. Ďalšiu nevýhodu

predstavujú vysoké náklady (Purchartová *et al.*, 2015). V súčasnosti sa preto ako iná alternatíva vyvíjajú PAPS-nezávislé bakteriálne arylsulfotransferázy (Obr. 3), ako napríklad arylsulfotransferáza (AST) z baktérie *Desulfitobacterium hafniense*, ktorá je kombinovaná s donorom sulfátu, ako *p*-nitrofenyl sulfát, N-hydroxysukcimid sulfát či ďalšie sulfátové donory (Purchartová *et al.*, 2015; Valentová *et al.*, 2017; Brodsky *et al.*, 2022; Kolařiková *et al.*, 2022). Viacero arylsulfatáz už týmto spôsobom preukázalo svoju úspešnosť pri sulfatácií flavonoidov či flavolignanov. Tieto typy sulfatácie majú veľa výhod vrátane ich rýchlosti, možnosti prebiehania za miernych podmienok, tolerancie mnohých substrátov či možnosti použitia na syntézu v rozsahu desiatok až stoviek miligramov výsledných produktov. Jedná sa o veľmi efektívnu metódu, pri ktorej vieme pripraviť metabolity identické tým, ktoré sa tvoria pôsobením enzýmov cicavcov (Valentová *et al.*, 2018; Káňová *et al.*, 2020).

V štúdií Káňová *et al.* (2020) uplatnili chemoenzymatický prístup pomocou AST z *D. hafniense* na sulfatáciu troch flavonoidov a to konkrétne kvercetínu, myricetínu a ampelopsínu. Ako hlavné produkty sa tvorili 3'-O-sulfáty, ktoré tvorili viac ako polovicu výťažku reakcie. Pri 4'-O-sulfátoch pozorovali, že došlo najprv k zvýšeniu koncentrácie, následne však došlo k postupnému klesaniu pravdepodobne kvôli premene týchto látok na disulfáty, čo bolo pozorované už pri kvercetíne. Po izolácií a purifikácií konštatovali pomerne nízke výťažky výsledných sulfátov kvôli nedokončenej konverzii výsledných produktov a strát pri extrakcii. Na dosiahnutie vyšších výťažkov by mohlo pomôcť ďalšie optimalizovanie a stanovenie lepších podmienok.



Obrázok 3: Sulfatácia flavonoidov arylsulfatázami, a: myricetín, b: ampelopsín. Zdroj: (Káňová *et al*., 2020)

2.4 Metabolizmus flavonoidov v ľudskom organizme

Metabolizmus flavonoidov môžeme rozdeliť do dvoch fází. Prvá fáza zahŕňa reakcie, pri ktorých sa flavonoid mení na viac polárny metabolit odkrytím alebo *de novo* formovaním funkčných skupín. Druhá fáza predstavuje reakcie, kedy sa flavonoidy transformujú na lepšie vylúčiteľnú formu (Glatt, 2000; Anzenbacher & Anzenbacherova, 2001; Jancova *et al.*, 2010). Veľká časť flavonoidov, ktoré organizmus príjme sa neobsorbuje v proximálnom čreve, ale putuje ďalej do hrubého čreva, kde sú flavonoidy vystavené hydrolýze a fermentácií mikróbmi. Vylučovanie flavonoidov z tela prebieha cez obličky, z črevného epitelu a vylučovaním žlče. Tie flavonoidy, ktoré sú vylúčené žlčou do dvanástnika sú vystavené pôsobeniu mikrobiálnych enzýmov a môžu sa reabsorbovať, čím sa spustí enterohepatálna recyklácia (Manach & Donovan, 2004; Walle, 2004; Lampe & Chang, 2007).

Počas prvej fáze metabolizmu (Obr. 4) sa môžu vytvárať funkčné skupiny ako napríklad -OH, NH_2 alebo -SH. Medzi reakcie, ktoré v tejto fáze prebiehajú je možné zahrnúť *N*- a *O*- dealkyláciu, alifatickú a aromatickú hydroxyláciu, *N*- a *S*- oxidáciu, prípadne deamináciu. Za hlavnú triedu enzýmov sa v tejto fáze metabolizmu dajú považovať cytochrómy P450 (CYPs). Ide o skupinu hem enzýmov, ktorá uskutočňuje predovšetkým hydroxylácie a teda má funkciu monooxygenáz, dioxygenáz a hydroláz (Anzenbacher & Anzenbacherova, 2000). Na flavonoidy v tejto fáze pôsobia hlavne CYPs monooxygenázy (Hodek *et al.*, 2002; Otake *et al.*, 2002). Prvá fáza metabolizmu prebieha v črevnom epiteli a vzniknuté metabolity sa následne transportujú do pečene vratnou žilou. V pečeni sa uskutočňuje ďalšia časť prvej fázy metabolizmu (Manach & Donovan, 2004; Walle, 2004; Lampe & Chang, 2007). Produkty oxidácie pochádzajúce z tejto fáze, však zvyknú byť minoritnými metabolitmi väčšiny flavonoidov, čo je zapríčinené pravdepodobne rýchlou glukoronidáciou, sulfatáciou alebo metyláciou potenciálnych substrátov fázy 1 v čreve alebo pečeni konjugačnými enzýmami ako glukoronozyltransferázy, sulfotransferázy alebo katechol-*O*-metyltransferázy (Lampe & Chang, 2007; Chen *et al.*, 2014).

Hlavným účelom 2. fáze metabolizmu sú konjugačné reakcie medzi ktoré radíme glukoronidáciu, sulfatáciu, metyláciu, acetyláciu, konjugáciu glutatiónu a aminokyselín. U flavonoidov druhá fáza prebieha naďalej v pečeni, kontinuálne po prvej (Lampe & Chang, 2007; Chen *et al.*, 2014). Vzniknuté konjugáty sú viac hydrofilné ako pôvodný substrát. Enzýmy zapájajúce sa do tejto fáze u flavonoidov sú najmä transferázy, a to konkrétne UDP-glukoronosyltransferázy a sulfotransferázy. V druhej fáze tiež pôsobia

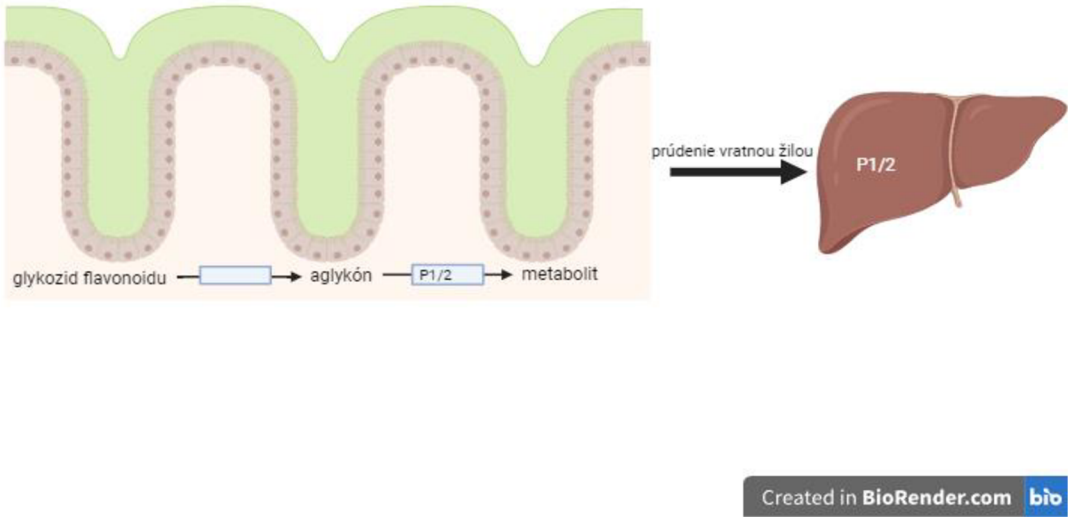
katechol-*O*-metyltansferázy, ktoré však tvoria konjugáty, ktoré sú hydrofóbnejšie než pôvodný substrát (Glat, 2000). Vylučovanie metylovaných konjugátov a sulfátu glukuronidu môže vďaka ich polarite prebiehať cez obličky v moči alebo žlčou. Taktiež môžu byť transportované ABC (kazeta viažúca ATP)-sprostredkovaným efluxom späť do črevného lumenu. V plazme a v moči je vo všeobecnosti väčšina konjugátov tvorená glukoronidmi (Schär *et al.*, 2015). Mechanizmy konjugácie sú veľmi efektívne a aglykóny sa v obehu buď vôbec nevyskytujú alebo ich koncentrácia je veľmi nízka po fyziologickom príjme.

UDP-glukoronosyltransferázy zodpovedajú za katalýzu prenosu glukuronovej kyseliny z UDP-glukuronovej kyseliny na flavonoidy (Mackenzie *et al.*, 2005). Glukoronidácia flavonoidov je regiošpecifická a závislá od izoformy (Brand *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2010). Sulfotransferázy majú funkciu v prenose sulfátovej časti k flavonoidom prostredníctvom koenzýmu PAPS. Táto skupina enzýmov tvorí u ľudí génovú superrodinu s viac než 10 rôznymi izoformami sulfotransferáz (Teubner *et al.*, 2007; Riches *et al.*, 2009). Hlavne sulfotransferázy 1A1, 1A2, 1A3, 1A4 a 1E1 sa podieľajú na metabolizme flavonoidov (Pai *et al.*, 2001; Otake *et al.*, 2002; Nakano *et al.*, 2004; Nowell & Falany, 2006; Ung & Nagar, 2007; Brand *et al.*, 2010). Sulfatované flavonoidy, ktoré sa tvoria týmto procesom, sa radia medzi polárnejšie metabolity a sú schopné ľahkého prenosu v krvi či vylučovania v moči. Aj keď je rola sulfatácie flavonoidov v živočíšnych organizmoch pomerne jasná, ešte stále je potrebné podrobnejšie preštudovať a vysvetliť substrátovú špecificitu, mechanizmus a funkciu tejto reakcie (Xia *et al.*, 2007; Hirschmann *et al.*, 2014; Cassidy & Mnihane, 2017). Ďalšia skupina enzýmov typických pre druhú fázu, katechol-*O*-metyltransferázy, má funkciu v *O*-metylácií katecholových polyfenolov ako katechínov, epikatechínov a epigalokatechínov, ktoré patria do podtriedy flavan-3-olov. Metylácia týchto substrátov spôsobuje zníženie hydrofilnosti a po tejto reakcii je potrebná následná glukoronidácia a sulfatácia, aby bolo možné efektívne vylúčenie týchto látok z tela (Inoue- Choi *et al.*, 2010). O absorpcii flavonoidov tkanivami a ich následnom rozdelení nie je dostatok informácií. Zopár štúdií, ktoré sa zameriavali predovšetkým na antokyány, uviedli, že bilitranslokáza sa zapája do vstrebávania flavonoidov z cievneho epitelu a pečene a do absorpcie antokyanínov zo žalúdka (Passamonti *et al.*, 2003; Maestro *et al.*, 2010; Ziberna *et al.*, 2012; Ziberna *et al.*, 2013).

S prvou a druhou fázou metabolizmu je spojených viacero biomolekúl ako proteín rezistencie rakoviny prsníka (BCRP/ABCG2), polypeptid transportujúci organický

anión (OATP) a transportéry organických aniónov 1 a 3, ktoré sú exprimované v bazolaterálnych membránach obličkových tubulov a považujú sa za dôležité aspekty eliminácie flavonoidov. To, že transportér organických aniónov sa nadexprimuje, sa spája s efektívnym vychytávaním metabolitov z obličiek a ich vylučovaním v moči (Brand *et al.*, 2006; Wong *et al.*, 2011; Nigam *et al.*, 2015; Tian *et al.*, 2015). Biologicky dostupné metabolity flavonoidov sa taktiež môžu vylúčiť prostredníctvom žlče do stolice, aj keď enterohepatálna recirkulácia má za následok recykláciu istého množstva metabolitov späť do tenkého čreva vylučovaním žlče (Crozier *et al*, 2010; Ma *et al.*, 2010).

V poslednej dobe je podporovaný postoj para-hormózy, ktorý hovorí o tom, že flavonoidy s ich slabou prooxidačnou aktivitou môžu stimulovať mechanizmy bunkovej cytoprotekcie vychádzajúce z dráhy NRF2/ARE. Para-hormóza je založená na tom, že v skutočnosti je oveľa viac pravdepodobný antioxidačný mechanizmus redukcie hydroperoxidov pôsobením enzýmov než neenzymatické odstraňovanie voľných radikálov a iných oxidantov, s tým, že antioxidanty prijímané v potrave zvyšujú množstvo antioxidačne pôsobiacich enzýmov a ich substrátov (Forman *et al.*, 2014; Forman & Ursini, 2014). Nízka biologická dostupnosť jednotlivých flavonoidov (koncentrácia v plazme max. 1 μM) a komplexnosť ich metabolizmu však nie sú obvykle v týchto teóriách brané do úvahy (Scalbert & Williamsom, 2000; Del Rio *et al.*, 2013; Rothwell *et al.*, 2016). Po konjugačných reakciách prebiehajúcich v druhej fáze metabolizmu môže byť koncentrácia sulftovaných metabolitov flavonoidov v plazme vyššia (Del Rio *et al.*, 2013; Pimpao *et al.*, 2015; Almeida *et al.*, 2018). Vďaka vyššej koncentrácií sa tak flavonoidy po sulfatácií stávajú dostupnejšími látkami na študovanie metabolizmu, čím majú zastúpenie medzi zlúčeninami s teoreticky zaujímavými biologickými charakteristikami (Kolařiková *et al.*, 2022).



Obrázok 4: Zjednodušená schéma metabolizmu flavonoidov. P1/2: fáza 1/2. Vytvorené pomocou softwaru Biorender.

2.5 Biologické účinky flavonoidov

Flavonoidy disponujú viacerými dobrými vlastnosťami pre ľudské zdravie. Príkladmi týchto benefitov sú napríklad antioxidačné vlastnosti (Alzand *et al.*, 2012; Pal *et al.*, 2013), regulácia telesnej hmotnosti (Tominaga *et al.*, 2006; Jeggins *et al.*, 2017), ochrana pred kardiovaskulárnymi ochoreniami (Wang *et al.*, 2013; Kruger *et al.*, 2014), alergiami (Castell *et al.*, 2014) a krehkosťou ciev (Alqurashi *et al.*, 2016; Terao *et al.*, 2017), bakteriálnymi či vírusovými ochoreniami (Boubakeur *et al.*, 2015; Phanstiel *et al.*, 2017), protizápalová aktivita (Serafini *et al.*, 2010; Marzocchella *et al.*, 2011; Peluso *et al.*, 2013), prevencia neurodegeneratívnych ochorení súvisiacich s vekom (Shackelford, 2005; Beking & Vieira, 2010), účinky proti agregácií krvných doštičiek a vplyv na transport iónov (Trischitta *et al.*, 2006; Faggio *et al.*, 2017; Raffa *et al.*, 2017).

Prospešné charakteristiky flavonoidov sa vedia uplatniť aj v chemoterapii. Vysoký prísun čerstvého ovocia a zeleniny, ktorá obsahuje vitamíny A, C a E, β- karotén, flavonoidy a ďalšie zložky dokáže ochrániť pred niekoľkými bežnými rakovinami postihujúcimi človeka ako napríklad rakovina pľúc, prsníka, prostaty a hrubého čreva (Neuhouser, 2004; Pathak *et al.*, 2014). Konzumácia flavonoidov dokonca môže ochrániť pred rakovinou spôsobenou fajčením (Woo *et al.*, 2013). Tieto fenolové zlúčeniny môžu mať chemopreventívne vlastnosti, keďže dokážu zasiahnuť do niekoľkých mechanizmov charakteristických pre rakovinu, ako inhibícia rastu a proliferácie buniek prostredníctvom zastavenia bunkového cyklu, indukcie apoptózy a diferenciácie alebo spojením týchto mechanizmov (Menezes *et al.*, 2016). V podmienkach *in vitro* flavonoidy vykazujú proti nádorové účinky na rozličné bunkové línie. Kvercetín a flavóny pomáhajú pri rakovine pľúc, kvercetín spolu s chalkónmi reagujú na rakovinu ústnej dutiny. Ďalšie flavonoidy ako apigenín, kaempferol, katechín, luteolín a genisteín majú účinok pri rakovine štítnej šľazy (Durga *et al.*, 2014). Rastlinné flavonoidy ako účinné látky môžu mať schopnosť oddialiť starnutie nervového systému, imunitných orgánov, reprodukčnej sústavy, pečene a kože a taktiež prispieť pri prevencii osteoporózy, kardiovaskulárnych ochorení či Alzheimerovej choroby (Fernandes *et al.*, 2017; Lou *et a*l., 2017; Imran *et al.*, 2019; Selvakumar *et al.* 2020).

Záujem o terapeutické účinky flavonoidov sa rozvinul aj pri ich sulfatovaných derivátoch, keďže viaceré štúdie potvrdili farmaceutické účinky týchto zlúčenín. Najviac zdôrazňovali najmä ich antikoagulačné, protizápalové a protinádorové účinky

(Correia-da-Silva *et al.*, 2014; Teles *et al.*, 2015). Sulfatácia ako reakcia, pri ktorej dochádza k štruktúrnej modifikácií dokáže zmeniť niektoré charakteristiky flavonoidov ako ich rozpustnosť, stabilitu a taktiež ich účasť na biologických procesoch (Tsao, 2010). Sulfatované deriváty ako negatívne nabité zlúčeniny sa lepšie rozpúšťajú vo vode a tento negatívny náboj je potrebný pri interakcii s biologickými cieľmi. Z týchto už vyššie uvedených biologických účinkov bolo viacero študovaných a pri antikoagulačných vlastnostiach sa zistilo, že antikoagulant heparín, ktorý sa nachádza v ľudskom tele, pravdepodobne umožňuje väzbu sulfatovaných flavonoidov na receptory heparínu vďaka ich negatívnemu náboju (Gunnarsson & Desai, 2002; Correia-da- Silva *et al.*, 2014). Taktiež sa zisťoval potenciál protizrážacích vlastností u izoharmetínu a perzikánu ako jeho sulfatovaného derivátu. Perzikán má vďaka jeho sulfatovanej skupine lepšie účinky pre narušenie zrážania krvi, čo môže znamenať, že sulfátová skupina túto funkciu reguluje. Kvercetín 3,7,3',4'-tetrasulfát a kvercetín 3-acetyl-7,3',4'-trisulfát sa taktiež vyznačujú antikolagulačnými a antiagregačnými účinkami, keďže predĺžili čas zrážania (Gugliemone et al., 2005). Kvercetín persuflát bol tiež zaradený medzi látky s antikoagulačnými vlastnosťami (Correia-da- Silva *et al.*, 2014).

Sulfatované deriváty flavonoidov preukázali antioxidačnú aktivitu s tým, že zároveň sú schopné vychytávať superoxid produkovaný xantín-xantínoxidázou. Priebehalo porovnanie antioxidačných vlastností u sulfatovaných a nesulfatovaných flavonoidov za použitia DPPH analýzy (1,1-difenyl-2-pikryhydrazyl). Konkrétne sa zamerali na kvercetín a kvercetín-3'-sulfát a kvercetín-3,3'-disulfát, s výsledkom, že ak hydroxylová skupina bola nahradená sulfátovou, tak sa antioxidačná aktivita výrazne znižovala (Op de Beck *et al.*, 2003).

Z horčiaka pieprového (*Polygonum hydropiper*) boli izolované niektoré flavonoidy pre posúdenie ich antioxidačných vlastností. Bolo zistené, že kvercetín-3-sulfát a izohamnetín-3,7-disulfát vykazovali lepšie antioxidačné vlastnosti než α-tokoferol, ktorý je považovaný sa silný prirodzený antioxidant (Yagi *et al.*, 1994). Sulfatované deriváty z tejto rastliny taktiež silno inhibovali aktivitu aldózoreduktázy. Tento enzým funguje ako katalyzátor redukcie viacerých aldehydov a redukuje glukózu na sorbitol. Vysoká vnútrobunková koncentrácia sorbitolu má za následok hyperosmotické podmienky spôsobujúce stratu čírosti šošovky pri šedom zákale. Najväčšiu inhibičnú aktivitu na aldózoreduktázu v šošovke z testovaných flavonoidov z *Polygonum hydropiper* mal izohamnetin-7-disulfát. Dokonca sa ukázalo, že ak by sa sulfátová

skupina odstránila, tak by to znížilo inhibíciu aldózoreduktázy. Sulfatované deriváty flavonoidov teda môžu mať funkciu v prevencii šedého zákalu (Haraguchi *et al*., 1996). Ďalšia štúdia, ktorá sa zameriavala na antioxidačné vlastnosti týchto látok potvrdila, že kaempferol-6 metyl ester 3-sulfát má okrem antioxidačnej funkcie aj inhibičný účinok na acetylcholín esterázu. Pri etanolovom extrakte z rastliny *Flaveria bidentis* zistili, že vykazuje účinok na Alzheimerovu chorobu kvôli tomu, že sa v nej nachádza veľké množstvo sulfatovaných flavonoidov. Ak dochádza k strate sulfátovej skupiny, inhibícia acetylcholínesterázy je slabšia, čo predpokladá dôležitosť tejto skupiny pre interakciu s enzýmom (Valeria *et al*., 2013).

Jedna zo štúdií taktiež porovnávala cytotoxicitu sulfatovaných a nesulfatovaných flavonoidov. Konkrétne skúmali hispidulin-7-sulfát a luteolin-7-sulfát, a tie porovnávnali s ich pôvodnými substrátmi na kultúre myších buniek s melanómom, kde zistili, že sulfatované flavonoidy dokázali cytotoxicitu oslabiť. Luteonin-7-sulfát sa dokonca prejavil ako antimelanogénna molekula, čo naznačuje jeho využitie pri kontrole nežiadúcej pigmentácie kože. Dokonca kombináciou acetín-7-sulfátu a izokutelareín 4'-metyleter-8-sulfátu do zmesi získaných z *Wissadula periplocifolia* získame zlúčeninu aktívnu voči rakovinovým bunkám prostaty PC-M3 a rakovinovým bunkám mozgu UVW (Teles *et al*., 2015; Kwak *et al*., 2016).

2.6 Transkripčný faktor NRF 2

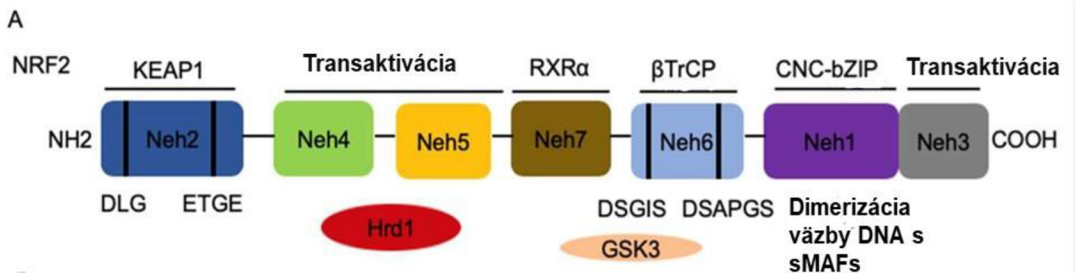
Pre zdravie a prežitie organizmu je potrebné udržiavanie homeostázy. Všadeprítomnosť environmentálneho stresu spôsobuje to, že živé organizmy sa mu nevyhnú. Jeho hrozba spočíva v tom, že dokáže narušiť funkcie buniek. Na obranu voči stresom organizmu slúžia definované regulačné mechanizmy, ktorými sa organizmus vie prispôsobiť. Transkripčný faktor NRF2 (nuclear factor erythroid 2-related factor) je známy ako jeden z hlavných organizátorov odpovede bunky na oxidatívny a xenobiotický stres. NRF2 je kódovaný jadrovým faktorom 2 príbuznému erytroidnému faktoru 2 (*Nfe2l2*) a je súčasťou Cap'n'Collar (CNC) podrodiny transkripčných faktorov bazických zipov leucínu (bZIP). Táto podrodina sa skladá z nuclear factor erythroid- derived 2 (NFE2) a NRF1, NRF2 a NRF3 (Jaramillo *et al.*, 2013). NRF2 obsahuje sedem konzervovaných homológnych domén NRF2-ECH (Neh) (Obr. 5), ktoré kontrolujú aktiváciu transkripcie pomocou rôznych funkcií (Jaramillo & Zhang, 2013). Expresia NRF2 prebieha vo všetkých typoch buniek. Množstvo NRF2 v bunke je regulované a jeho kontrola je zabezpečená prostredníctvom štyroch komplexov E3 ubikvitín ligáz, ktoré spôsobujú ubikvitinyláciu a proteozomálnu degradáciu.

Hlavná úloha NRF2 spočíva v tom, že zodpovedá za antioxidačnú odpoveď na stres, čím sa zapája do metabolizmu. Expresia génov na ochranu buniek obsahujúcich prvky antioxidačnej odpovede (ARE) spustená NRF2 pri reakcii na bunkový stres tvorí sieť spolupôsosobiacich enzýmov. Vďaka tomu sa eliminujú prooxidanty a udržiava sa bunková homeostáza (Hayes *et al.*, 2014). Čo sa týka ostatných cieľových génov NRF2 a jeho funkcií, v niekoľkých nedávnych štúdiách sa potvrdili ďalšie cieľové gény NRF2 s novými funkciami, ktoré nezahŕňajú iba reguláciu redukcie ale súvisia aj s regulovaním zápalu, metabolizmu, proteostázy, autofágov a odpovede na nezložené proteíny, hlavne pri karcinogenéze (Feng He *et al.*, 2020). V oblasti výskumu zápalu, metabolizmu, prevencie a liečby rakoviny sa NRF2 stal hlavnou témou, pretože jeho funkcie sú oveľa rozsiahlejšie než sa prvotne predpokladalo. Ak budeme vedieť, čo stojí za reguláciou aktivity NRF2, poskytne to nové možnosti pre liečbu rakoviny prostredníctvom cieleného pôsobenia na NRF2.

NRF2 aktivuje transkripciu génov naviazaním na ARE v mieste promotora viacerých génov pre obranu buniek. V promotorovej oblasti génu *NFE2L2* sa nachádza ARE, čo umožňuje NRF2 priamo aktivovať svoju vlastnú transkripciu, čím sa spúšťa mechanizmus pozitívnej spätnej väzby na posilnenie pôsobenia NRF2. Je zodpovedný aj za aktiváciu transkripcie génov, ktoré kódujú enzýmy s antioxdiačným účinkom a to

HMOX1 a *NQO1*. NAD(P)H: chinónoxidoreduktáza 1 (NQO1) sa zapája do prvej fáze metabolizmu a hemoxygenáza 1 (HMOX1) pôsobí v druhej fáze metabolizmu, kedy reguluje hem a železo.

Hem patrí medzi koordinančné komplexy pozostávajúci z iónu železa koordinovaného s porfyrínom Jeho pôsobenie prebieha v mnohých mitochondriálnych komplexoch a enzýmoch CYP 450, v syntázach, ktoré signalizujú oxid dusnatý, u myoglobínu uskladňujúceho dusík a hemoglobínu, prenášača kyslíka. Železo však dokáže prispievať k tvorbe škodlivých kyslíkových radikálov, a tak musí byť syntéza a deštrukcia hemu viazaného na železo dôkladne regulovaná. Ferochetaláza je priamym cieľovým génom NRF2 a funguje ako kľúčový enzým pri biosyntéze hemu, keďže katalyzuje jej posledný krok vložením železitého iónu do protoporfyrínu, čím sa vytvorí hem kofaktor (Chorley *et al*., 2012). Hem sa v cytosole degraduje na železitý ión, oxid uhoľnatý a biliverdín hemoxygenázou 1. Z biliverdínu sa potom stáva bilirubín, ktorý má funkciu antioxidantu zachytávajúceho voľné radikály a môže byť glukoronidázou určený na vylúčenie. To sa deje pomocou biliverdín reduktázy A alebo biliverdín reduktázy B, ktorých expresia závisí od NRF2 (He *et al*., 2001; Kerins *et al*., 2018; He *et al*., 2020).



Obrázok 5: Schéma transkripčného faktora NRF2: NRF2 obsahuje 7 konzervovaných domén homológie NRF2-ECH (Neh1- Neh7). Zdroj: (Feng He *et al*., 2020)

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

DPPH 1,1- diphenyl-2-pikrylhydrazyl (Sigma, kat. č. D9132)

Dimetylsulfoxid (Sigma, kat. č. D2650; DMSO)

Kvercetín (Obr. 6)(Sigma, kat .č. Q4951)

Metanol p. a. (MeOH)

RNase-free voda

Sulforafan (Obr.6)(Sigma, kat. č. S6317)

Triton X-100 (Berg, kat č. 11869)

3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5 difenyltetrazoliumbromid (Sigma, kat č. M2128;MTT soľ)

3.1.2 Prístroje

Analytické váhy (Mettler Toledo. USA)

Centrifúga Eppendorf MiniSpin (Eppendorf, Nemecko)

Centrifúga Rotina 38R (Hettich, USA)

Inkubátor Sanyo CO_2 (Sanyo, Japonsko)

Reader multifunkčný Infinite M200 Pro (TECAN, Švajčiarsko)

Svetelný mikroskop Olympus CK40 (Olympus, Japonsko)

Termocycler LightCycler 480 II (Roche Diagnostcis, Nemecko)

Trepačka Vortex (Heidolph, Nemecko)

3.1.3 Roztoky

Antibiotiká Penicilín/Streptomycín (Sigma, P4333)

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems):

- RT buffer
- 25x dNTPs
- random primers
- MultiScribe
- 4,2 µl RNase-free voda

Fetálne bovinné sérum

Fyziologický roztok pufrovaný fosfátom (PBS), pH: 7,4

Médium DMEM (Sigma, kat. č. D5796; Dulbecco' s Modified Eagle Medium)

25 % NH_4OH

MTT roztok (bezsérové médium a MTT soľ v PBS, pomer 9:1)

TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems)

TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)

TRI Reagent (Ambion, USA)

1,5 % Triton-X100 v PBS

3.1.4 Biologický materiál

Semiadherentné bunky RAW264.7 cell line (č. 910 627 02, ECACC, Veľká Británia)

3.1.5 Študované látky

Nesulfatované flavonoidy (myricetín, ampelopsín, fisetín, hesperetín, apigenín, naringenín; Obr. 7) boli poskytnuté Ústavom mikrobiológie Akadémie vied ČR, Praha. Sulfatované deriváty testovaných flavonoidov (Obr. 8) boli pripravené pomocou arylsulfotransferázy z *Desulfitobacterium halfniense* na Ústave mikrobiológie Akadémie vied ČR.

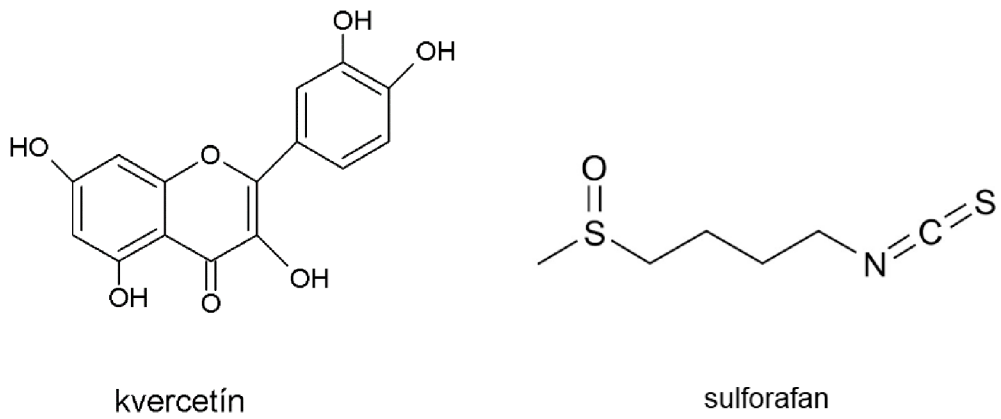
3.1.6 Software

ChemSketch - software pre kreslenie chemických štruktúr

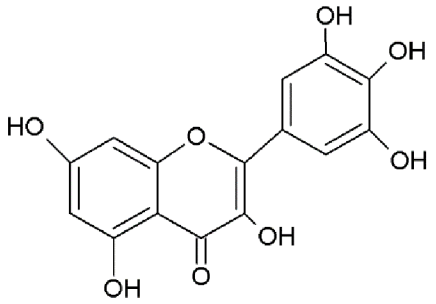
iControl (Tecan) - software pre reader M200 Pro

Light Cycler 480 (Roche) - software pre termocyklér

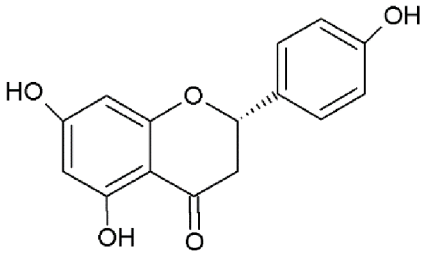
Microsoft Office 2403



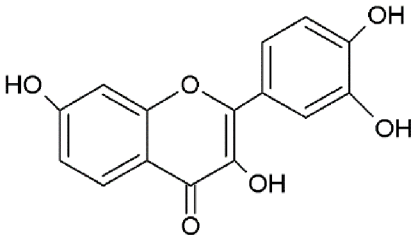
Obrázok 6: Štruktúry kontrolných látok. Vytvorené pomocou softwaru Chemsketch.



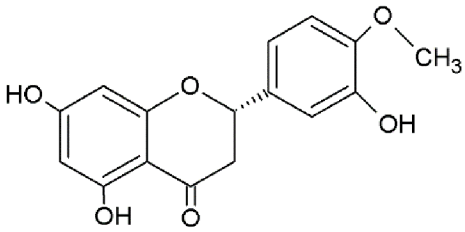
myricetin



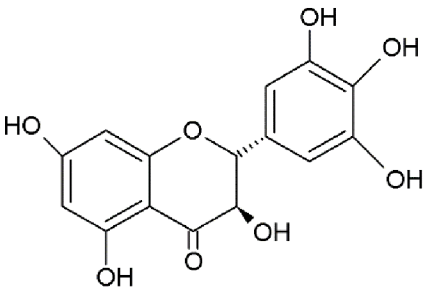
naringenin



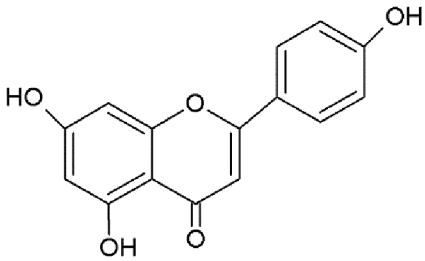
fisetin



hesperetin

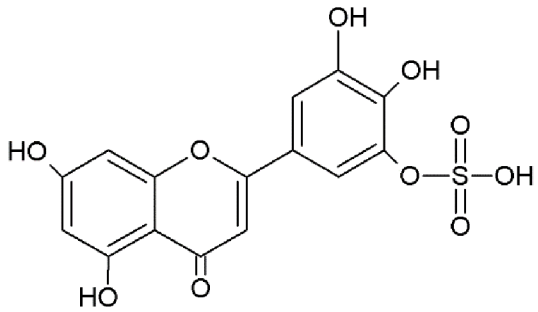


ampelopsin

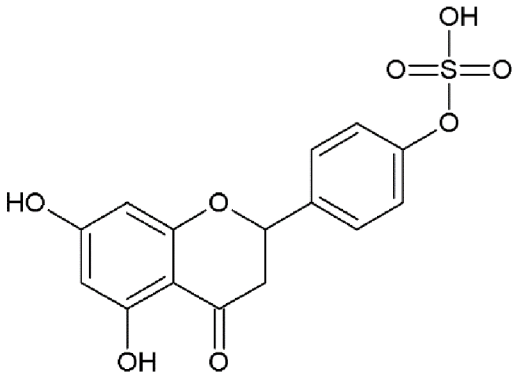


apigenin

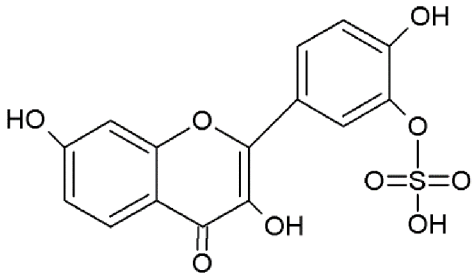
Obrázok 7: Štruktúry flavonoidov. Vytvorené pomocou softwaru ChemSketch.



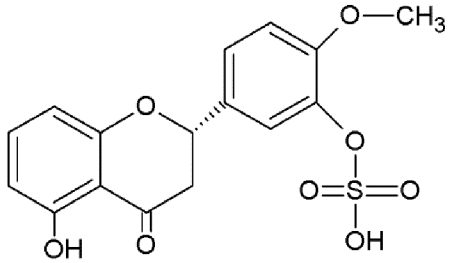
myrycetin-3'-*O*-sulfát



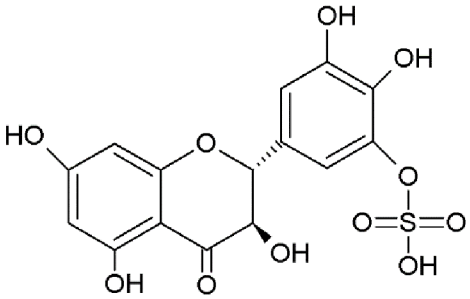
naringenin-4'-*O*-sulfát



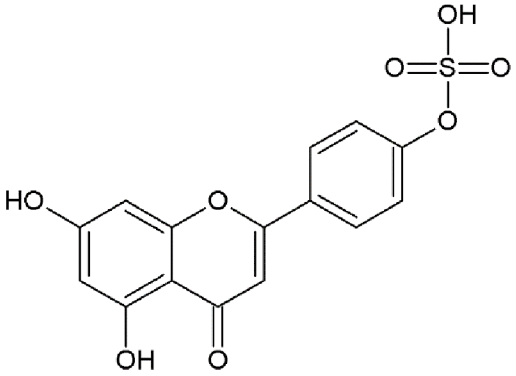
fisetin 3'-*O*-sulfát



hesperetin-3'-*O*-sulfát



ampelopsin-3'-*O*-sulfát



apigenin-4'-*O*-sulfát

Obrázok 8: Štruktúry sulfatovaných flavonoidov. Vytvorené pomocou softwaru Chemsketch.

3.2 Metódy

Postup práce pri príprave médií a kultivácií myších makrofágových buniek prebiehal v sterilných podmienkach vo flowboxe na predídenie prípadnej kontaminácií. Laboratórne sklo, s ktorým sme pracovali sa pred použitím vždy sterilizovalo plameňom liehového kahana. Hrdlá sterilných fliaš sa počas prípravy média sterilizovali. Fľaše určené na kultiváciu buniek museli byť po otvorení taktiež sterilizované pomocou kahana.

3.2.1 Príprava kultivačného média

Na kultiváciu myších makrofágových buniek sme používali sérové médium, ktoré obsahovalo DMEM (Dulbecco' s Modified Eagle Medium) doplnené o penicilin (100 U/ml), streptomycin (100 μg/ml) a 10% fetálne bovinné sérum (FBS). Médium sme pripravovali do sterilnej fľaše, na ktorú sme umiestnili filter. Do filtra sme preliali polovičný objem média z fľaše s DMEM, k tomu sme následne pridali antibiotiká a FBS. K filtru sme napojili vývevu od vákua a médium sme prefiltrovali. Po filtrácií sme filter zo sterilnej fľaše odstránili a fľašu sme vysterilizovali v plameni kahana. Pripravené médium sme zo sterilnej fľaše preliali do pôvodnej fľaše s DMEM médiom.

Médium určené na experimenty bolo bezsérové. Príprava prebiehala rovnako ako príprava média pre kultiváciu buniek, s tým rozdielom, že sme do neho nepridávali FBS.

3.2.2 Kultivácia myších makrofágových buniek RAW264.7

Pasáž buniek prebiehala po dosiahnutí 80 % pokrytia povrchu kultivačnej fľaše. Z fľaše s bunkami sme odsali staré médium, ktoré už malo vyčerpané živiny, a pridali sme do nej 10 ml čerstvého média. Pomocou bunkovej škrabky sme zoškrabali z dna fľaše bunky, ktoré boli priľnuté na jej povrch. Obsah fľaše sme odobrali do 50 ml plastovej skúmavky a premiešali. Štvrtinu objemu buniek sme premiestnili do novej fľaše, ktorú sme umiestnili do inkubátora. Inkubácia buniek prebiehala pri teplote 37°C a vo zvlhčenej atmosfére s obsahom 5 % CO_2.

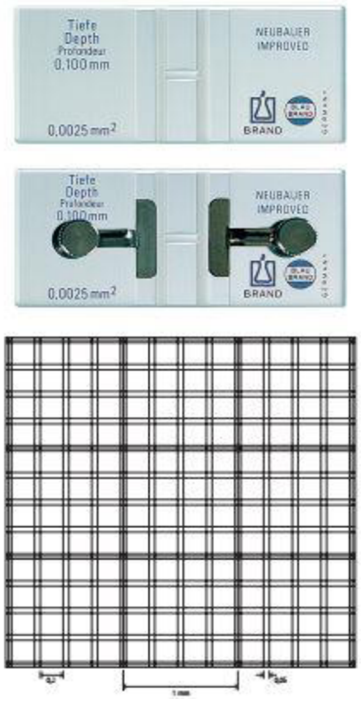
3.2.3 Vysievanie buniek pre experimenty

Postup pre vysievanie buniek na experimenty bol podobný ako pri pasážovaní, museli sme však vypočítať presný objem buniek, ktorý sme použili na vysievanie. Po odpipetovaní starého média, pridaní čerstvého média a premiestnení buniek do plastovej skúmavky nasledovalo pozorovanie buniek pod mikroskopom. Z plastovej skúmavky, v ktorej sa nachádzali zoškrabané bunky v čerstvom médiu sme odpipetovali 1 ml do 1,5 ml ependorfovej skúmavky na počítanie buniek pod mikroskopom v Bürkerovej

komôrke (Obr. 9). Komôrku sme prekryli krycím sklíčkom a odobrali 20 µl z ependorfovej skúmavky. Pod horný aj dolný okraj krycieho sklíčka sme pipetovali 10 µl buniek v médiu. Pripravili sme svetelný mikroskop na pozorovanie, kde sme nastavili 10-násobne zväčšenie a fázový kontrast. Bürkerovu komôrku sme umiestnili do svetelného mikroskopu a našli oblasť, v ktorej sa nachádzal štvorec skladajúci sa z deviatich menších štvorcov (Obr. 9B). V tomto štvorci sme zisťovali počet buniek. Tento postup sme zopakovali ešte dvakrát a celkovo sme tak spočítali bunky v troch štvorcoch. Z tejto hodnoty sme vypočítali priemerný počet buniek a zistili koľko ml bude potrebných na experiment. Médium s bunkami v plastovej skúmavke sme prepitovali a vypočítaný objem sme premiestnili do novej fľaše, ktorú sme umiestnili do inkubátora.

A

B



Obrázok 9: Počítacia komôrka podľa Bürkera. Prevzaté od: (https://www.fisherww.sk/index.php/view/productdetails/virtuemart_product_id/11663/virtuemart_category_id/) (5.12.2023).

3.2.4. Aplikácia testovaných látok k bunkám

Pre test cytotoxicity sme bunky vysiali do 24-jamkovej kultivačnej dosky v koncentrácií $0{,}17.10^6$ b/ml na jamku, pre PCR sme bunky bunky vysiali do 6-jamkovej kultivačnej dosky v koncentrácií 1.10^6 b/3 ml na jamku. Experimenty prebiehali v bezsérovom médiu po dobu 4 alebo 24 hodín pri teplote 37°C obsahujúcom 0,1 % DMSO ako negatívnu kontrolu. Pozitívnu kontrolu pre cytotoxicitu predstavoval 1,5 % Triton-X100, ktorý bol do jamky pipetovaný v pomere 1 ml média a 1 µl Triton-X100. Pozitívnu kontrolu pre PCR predstavoval 50 µM kvercetín a 5µM sulforafan. Študované látky sa používali v koncentráciách 1, 10, 25 a 50 µM.

3.2.5 Test cytotoxicity myších makrofágových buniek

Pre zistenie citlivosti buniek na jednotlivé flavonoidy a ich sulfatované deriváty sme použili test cytotoxicity- MTT test. Pracovali sme s myšími makrofágmi 264.7, ktoré boli inkubované s testovanými látkami, viď. posledná metóda. Tento test funguje na princípe redukčnej reakcie 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5 difenyltetrazoliumbromidu (MTT soľ). Pripravili sme MTT roztok, ktorý obsahoval bezsérové médium a MTT soľ rozpustenú v PBS v pomere 9:1. Po ukončení inkubácie buniek s flavonoidmi, ktorá trvala 4 hodiny, sme z jamiek s bunkami odsali médium a do každej jamky sme napipetovali 1 ml MTT roztoku. Doska s bunkami sa inkubovala po dobu 2 hodín. Vzorky sa pripravili na meranie tak, že sa z jamiek odsalo médium a pridal sa k nim roztok DMSO a 25 % NH_4OH pripravený v pomere 99:1, pipetovaný bol v objeme 0,5 ml a 1 ml na jamku podľa počtu buniek v jamke. Pôsobením roztoku došlo v jamkách k rozpusteniu buniek. Nasledovalo meranie na TECAN spektrofotometri pri vlnovej dĺžke 540 nm. Toto isté meranie sme vykonali aj s 96-jamkovou doštičkou. Do každej jamky sa pipetovalo 50 µl zmesi buniek s MTT roztokom- každá látka sa na doštičke nachádzala v dvoch opakovaniach. Do jednotlivých jamiek sme následne pridali 100 µl roztoku DMSO a 25% NH_4OH. Opäť sme doštičku umiestnili do TECAN spektrofotometra a zmerali absorbanciu. Získané hodnoty sme spracovali pomocou programu Excel a vypočítali viabilitu buniek.

3.2.6 Izolácia RNA

Po inkubácií buniek s látkami (4 hodiny) bola RNA extrahovaná pomocou činidla TRI reagent podľa doporučenia výrobcu. Koncentrácia RNA bola stanovená pomocou spektrofotometrie pri 260 nm. 2 µg RNA boli použité na reverznú transkripciu.

3.2.7 Reverzná transkripcia

Roztoky použité pri transkripcií sa rozmrazili pri izbovej teplote, používaná transkriptáza bola rozmrazená na ľade. Bol pripravený 2x RT Master Mix, ktorý pre reakciu v objeme 20 µl obsahoval 2 µl RT pufra, 0,8 µl 25x dNTPs, 2 µl random primerov, 1 µl MultiSribe RTázy a 4,2 µl vody pre molekulárne účely. Vzorky z buniek línie RAW264.7, s ktorými sme pracovali boli rozmrazené na ľade a vytemperované na izbovú teplotu a premiešané na vortexe. Do 1,5 ml skúmavky sa napipetovala voda pre molekulárnu biológiu na celkový objem s RNA 10 µl. Následne sa pipetovali vzorky, ktoré obsahovali 2 µg RNA. K vzorkám bol následne pridaný RT MasterMix v množstve 10 µl a vzorky sa dali na krátku dobu scentrifugovať. Vzorky boli ponechané na inkubáciu po dobu 10 minút pri 25°C. Po inkubácií nasledovala samotná transkripcia, ktorá prebiehala 2 hodiny pri 37°C v termomixéri pri 0 rpm a 5 s pri 85°C. Po ukončení transkripcie bola vzniknutá cDNA scentrifugovaná, nariedená a uložila sa do -20°C.

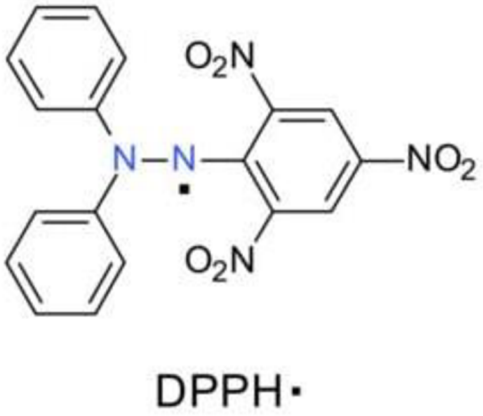
3.2.7 Real-time PCR

Používané roztoky pre real-time PCR, TaqMan Master Mix a TaqMan Gene Expression Assay (GEx assay), sa najprv vytemperovali na izbovú teplotu. Gene Expression Assay sa podľa potreby krátko zcentrifugoval. Bol chránený pred svetlom a uchovával sa tak, aby sa minimalizovala potreba zmrazovania a rozmrazovania. Vzorky cDNA boli rozmrazené na ľade a zriedené vodou pre molekulárne účely a napipetovali sa do mikroskúmavky. Celkový objem bol stanovený na 10 µl na reakciu, vzorky cDNA boli pripravované v dublete a kontrola bez templátu bola pripravená v singlete. V ďalšom kroku bol pripravený MasterMix + GEx Assay v pomere 10:1 (5 µl Master Mixu a 0,5 µl GEx Assay), ktorý bol po príprave krátko scentrifugovaný. Do rezervy sa pripravili dve reakcie naviac. Na dosku pre PCR sme do každej jamky napipetovali 4,5 µl zriedenej cDNA alebo vody (kontrola bez templátu). K vzorkám sa pridala zmes MasterMix/GEx Assay v objeme 5,5 µl. Doska nachystaná pre real-time PCR bola prekrytá fóliou a vzorky sa scentrifugovali po dobu 2 minút pri 1500 g. Real- time PCR prebiehala v temocykléri LightCycler 480 II a amplifikácia DNA sa merala pomocou hydrolyzujúcej sondy s farbivom FAM (465/510 nm). Podmienky v termocykléri boli nastavené nasledovne: 2 min 50°C (aktivácia UNG), 10 min 95°C (denaturácia UNG, aktivácia Taq polymerázy), 15 s 95°C (denaturácia DNA), 1 min 60°C (annealing a polymerácia), 30 s 40°C (cooling). Hodnoty C_p (*crossing point*) boli získané pomocou softwaru Light Cycler 480 (Roche), následné spracovanie a vyhodnotenie

prebiehalo v programe Excel, kedy sa vypočítali relatívne zmeny v expresii génov rovnicou $2^{-\Delta\Delta CT}$. Výsledky boli štandardizované na množstvo mRNA *Gapdh*.

3.2.8 Zhášanie DPPH radikálu

Táto metóda slúžila na zistenie toho, či flavonoidy zhášajú 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazylový (DPPH) radikál (Obr. 10), skúmali sme teda ich antiradikálové vlastnosti. DPPH radikál je stabilnou molekulou s absorpčným maximom pri 515 nm. DPPH je rozpustný v metanole a je charakteristický svojim fialovým sfarbením. Absorpčné maximum dosahuje pri 515 nm. Antioxidanty alebo iné druhy radikálov reagujú s radikálom DPPH prostredníctvom poskytnutia elektrónu alebo atómu vodíka, čo redukuje DPPH, a mení jeho fialové sfarbenie na žltý produkt (Mfotie Njoya, E. 2021). Najprv sme flavonoidy zriedili v metanole na požadovanú koncentráciu. Pracovali sme s koncentráciami 10 a 50 µM. Roztok DPPH sme pripravili rozpustením 1 mg DPPH v 50 ml metanolu. Na 96-jamkovej doske sme do jamiek pipetovali 80 µl metanolu (kontrola) alebo 80 µl roztoku flavonoidov. Roztok DPPH sa ku kontrole a k flavonoidom pipetoval v objeme 160 µl. Ako blank bol použitý čistý metanol v objeme 240 µl. Flavonoidy boli s radikálom DPPH inkubované po dobu 30 minút pri izbovej teplote. Následne sa sledoval úbytok sfarbenia DPPH radikálu, ktorý potvrdil jeho redukciu danými flavonoidmi. Na spektrofotometri bola zmeraná absorbancia pri vlnovej dĺžke 517 nm. Namerané hodnoty sme spracovávali v programe Excel a vypočítali sme percento zhášania.

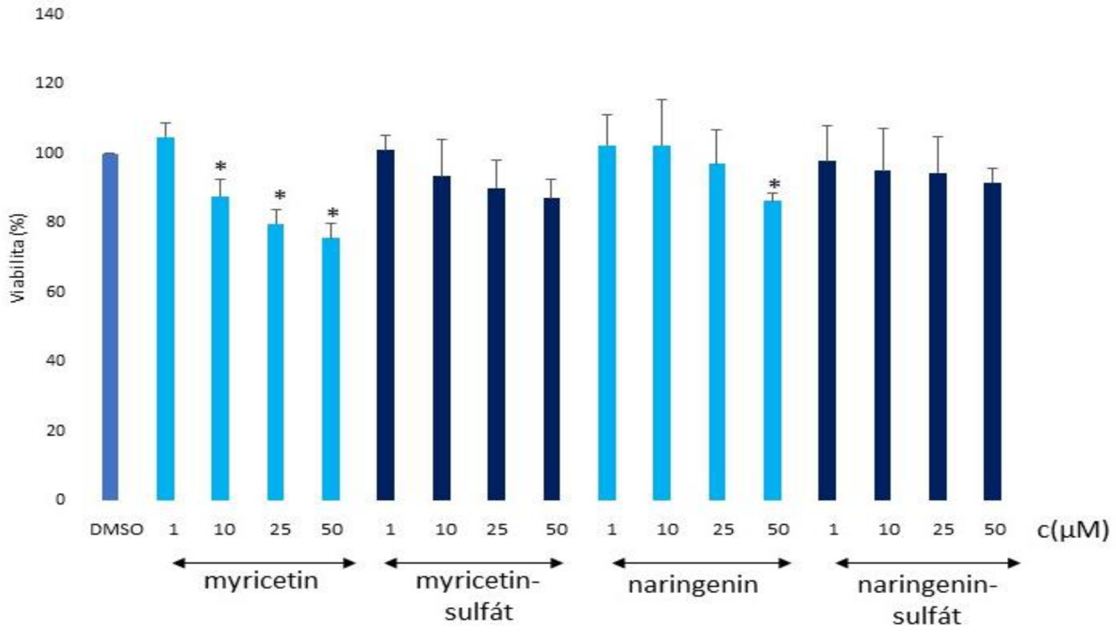


Obrázok 10: Vzorec DPPH radikálu. Zdroj: (Ionita , 2021)

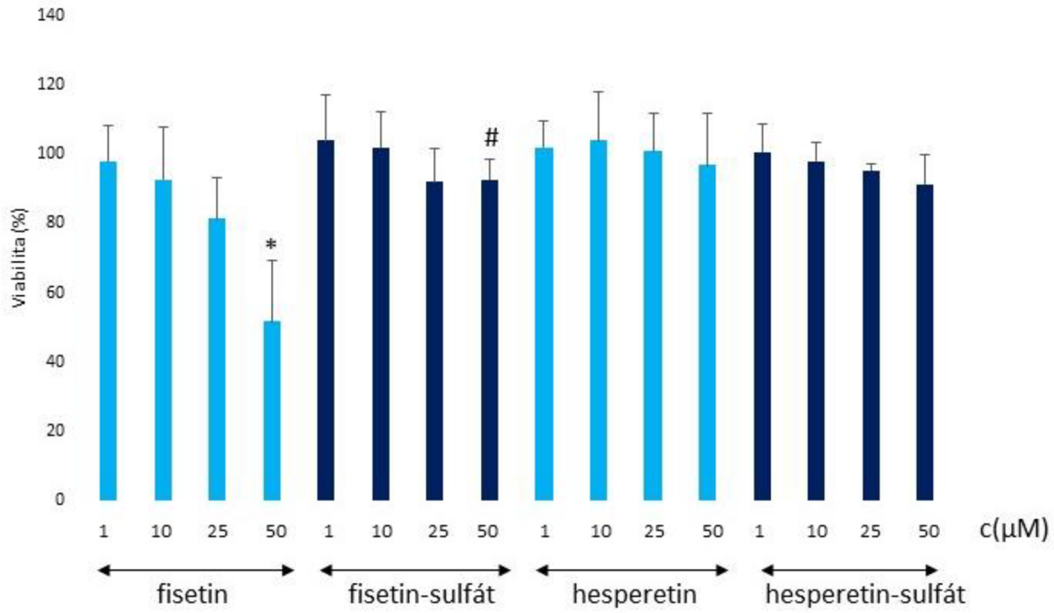
4 VÝSLEDKY

4.1 Stanovenie vplyvu flavonoidov na viabilitu buniek RAW264.7

Na testovanie vplyvu flavonoidov a ich sulfátov na viabilitu buniek sme použili MTT test. Pracovali sme s líniou buniek RAW264.7 (myšie makrofágy). Celý experiment prebiehal v bezsérovom médiu. Bunky boli najskôr inkubované s flavonoidmi a sulfatovanými derivátmi flavonoidov po dobu 24 hodín. Testovali sme myricetín, naringenín, fisetín, hepseretín, apigenín a ampelopsín a ich sulfáty. Flavonoidy mali koncentráciu 1,10,25 a 50 μM. Po redukcii roztokom MTT soli, inkubácií a zmeraní absorbancie sme mohli určiť viabitu. Ako negatívnu kontrolu sme použili DMSO, ktoré vykazovalo 100 % úroveň viability. S rastúcou koncentráciou miera viability klesala a začali sa prejavovať toxické účinky nesulfatovaných flavonoidov. Toxické účinky na bunky mali fisetín v 50 μM koncentrácií (50 % viabilita) a apigenín tiež v 50 μM koncentrácií (33 % viabilita.) (Obr. 12 a 13). Ostatné látky viabilitu buniek znížili len čiastočne. Naringenín a hesperetín nepôsobili na bunky toxicky. Myricetín spomedzi všetkých látok dosiahol najvyššiu úroveň viability (105 %) v 1 μM koncentrácií (Obr. 11). Sulfatované flavonoidy neboli pre bunky toxické, ani jedna z látok viabilitu významne neznižovala. Pri 1 μM koncentrácií pozorujeme u sulfatovaných derivátov vysokú úroveň viability na úrovni ~100 %, najvyššie hodnoty dosiahli fisetín (104% viabilita) a myricetín s hesperetínom (101 % viabilita) (Obr 11 a 12). Sulfatácia výrazne znížila toxický vplyv flavonoidov na bunky. Najväčší rozdiel medzi nesulfatovanou a sulfatovanou formou flavonoidu vidíme medzi fisetínom a apigenínom. Fisetín-3-*O*'-sulfát v 1 μM koncentrácií zvyšoval viabilitu o 55 % oproti jeho nesulfatovanej forme, apigenín-4'-*O*-sulfát zvyšoval životaschopnosť buniek v 1 μM koncentrácií o 40 % v porovnaní s jeho nesulfatovanou formou. Mierne zlepšenie viability buniek v porovnaní s nesulfatovanými flavonoidmi pozorujeme aj v prípade ampelopsín-3'-*O*-sulfátu (Obr. 13) a myricetin-3'-*O*-sulfátu (Obr.11).

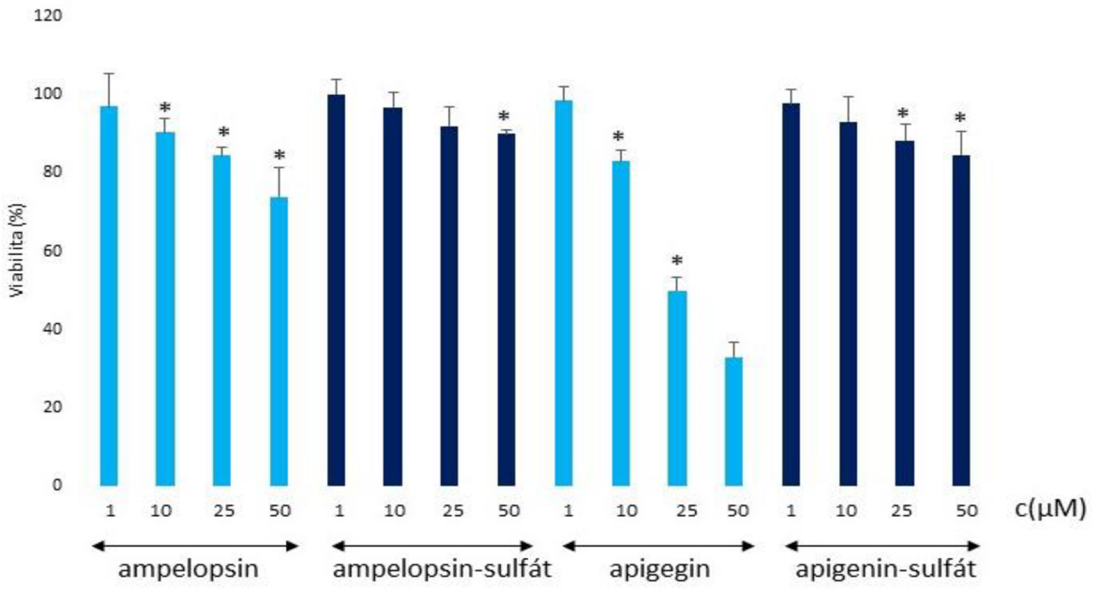


Obrázok 11: Test viability RAW 247.6 buniek s myricetínom, naringenínom a ich sulfátmi. Koncentrácia flavonoidov bola 1-50 µM. Experiment prebiehal v bezsérovom médiu a bunky boli inkubované najprv s flavonoidmi po dobu 24 hodín a následne s roztokom MTT soli na 2 hodiny. Po inkubácií bola stanovená viabilita buniek na spektrofotometri. Negatívna kontrola: DMSO. *p <0,05- významný štatistický rozdiel oproti kontrole.



Obrázok 12: Test viability RAW 247.6 buniek s fisetínom, hesperetínom a ich sulfatovanými derivátmi. Koncentrácia flavonoidov bola 1-50 µM. Experiment prebiehal v bezsérovom médiu a bunky boli inkubované s flavonoidmi na 24 hodín a následne s roztokom MTT soli na 2 hodiny. Po inkubácií sa stanovila viabilita pomocou spektrofotometra. *p <0,05- významný

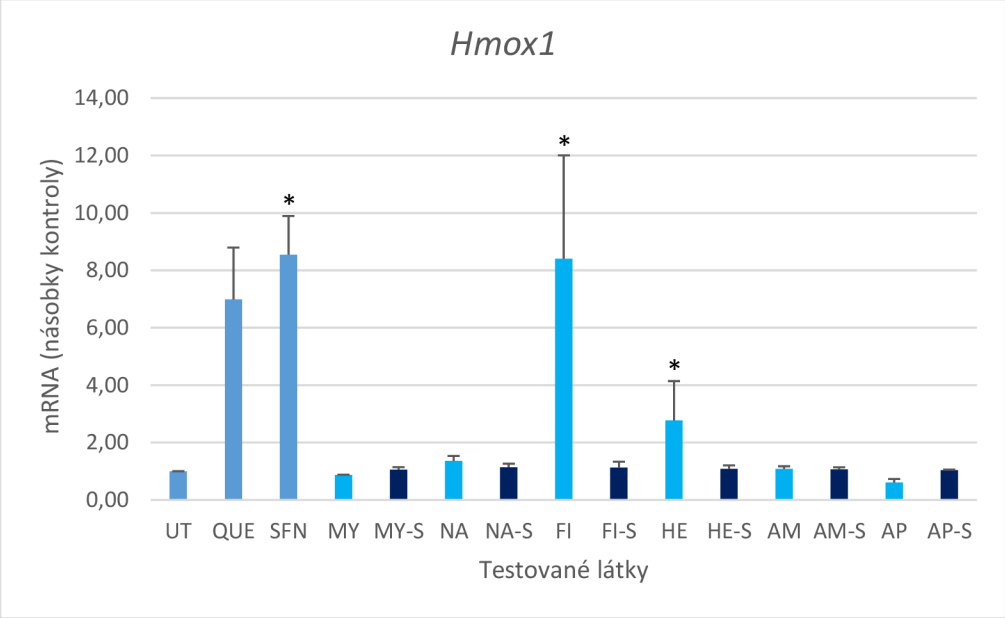
štatistický rozdiel oproti kontrole. *p <0.05- významný štatistický rozdiel oproti kontrole, #p< 0,05-významný štatistický rozdiel sulfatovaného oproti nesulfatovanému flavonoidu.



Obrázok 13: Test viability RAW 247.6 buniek s ampelopsínom a apigenínom a ich sulfatovanými derivátmi. Koncentrácia flavonoidov bola 1-50 μM. Experiment prebiehal v bezsérovom médiu a bunky boli inkubované s flavonoidmi po dobu 24 hodín a následne s roztokom MTT soli na 2 hodiny. Po skončení inkubácie sa stanovila viabilita pomocou merania na spektrofotometri. *p <0,05- významný štatistický rozdiel oproti kontrole.

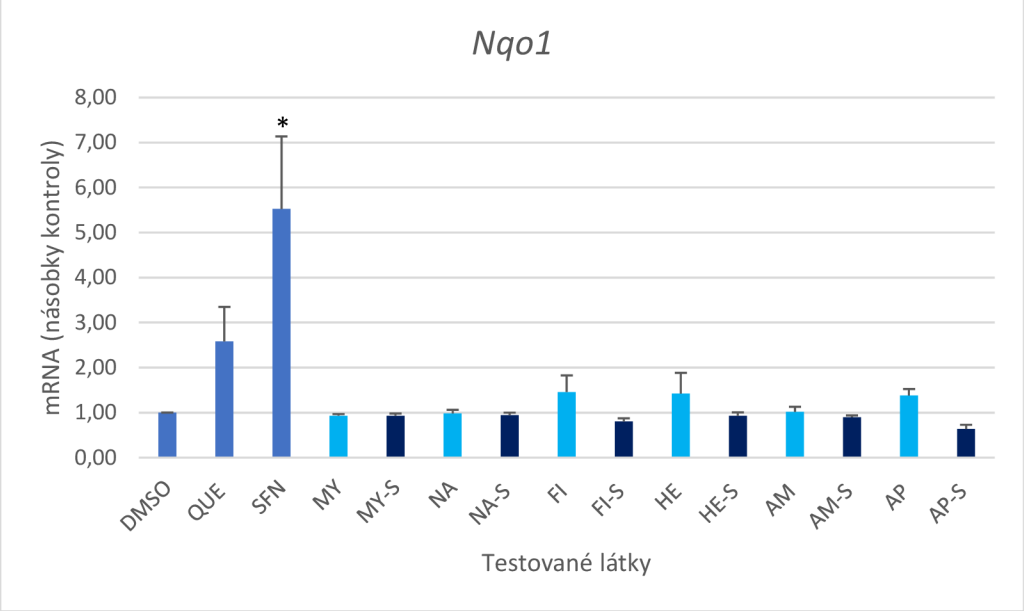
4.2 Kvantitatívna PCR (qPCR)

Po zistení vplyvu flavonoidov a ich sulfatovaných derivátov na viabilitu buniek sme sa zamerali na pôsobenie flavonoidov na expresiu nami vybraných génov. Doštička sa po napipetovaní vzoriek umiestnila do Termocyclera, kde sa následne pomocou počítačového softvéru prepojeného s prístrojom zisťovala indukcia expresie. Pracovali sme s rovnakými flavonoidmi ako pri MTT teste. Flavonoidy mali koncentráciu 50 µM, z dôvodu, že po 4 hodinovej inkubácií táto koncentrácia nepôsobí toxicky. Konkrétne sme sa zamerali na *Hmox1* (Obr.14), *Nqo1* (Obr. 15) a *Nfe2l2* (Obr. 16). Ako referenčný gén sme použili *Gapdh*. Pri všetkých troch génoch sú zobrazené hodnoty spriemerované z troch opakovaní. Pozitívnu kontrolu predstavoval kvercetín a sulforafan, ktoré indukovali expresiu *Hmox1* a *Nqo1*. Zo študovaných látok expresiu génu *Hmox1* indukoval iba fisetín (8,4-násobok) a hesperetín (2,8-násobok). Sulfatácia fisetínu a hesperetínu túto indukciu potlačila. Ostatné flavonoidy a ich sulfáty mali zanedbateľný vplyv na expresiu *Hmox1* (Obr. 14). Na expresiu *Nqo1* sme nezistili významný vplyv ani u jednej z testovaných látok. Mierne zvýšenie expresie (okolo 1,5-násobku) nastalo pôsobením fisetínu, hesperetínu a apigenínu (Obr. 15). Flavonoidy neovplyvňovali ani expresiu *Nfe2l2*. Experimenty tak ukázali, že indukcia expresie *Hmox1* nie je sprevádzaná indukciou expresie génu *Nfe2l2*, kódujúceho transkripčný faktor NRF2 (Obr. 16).

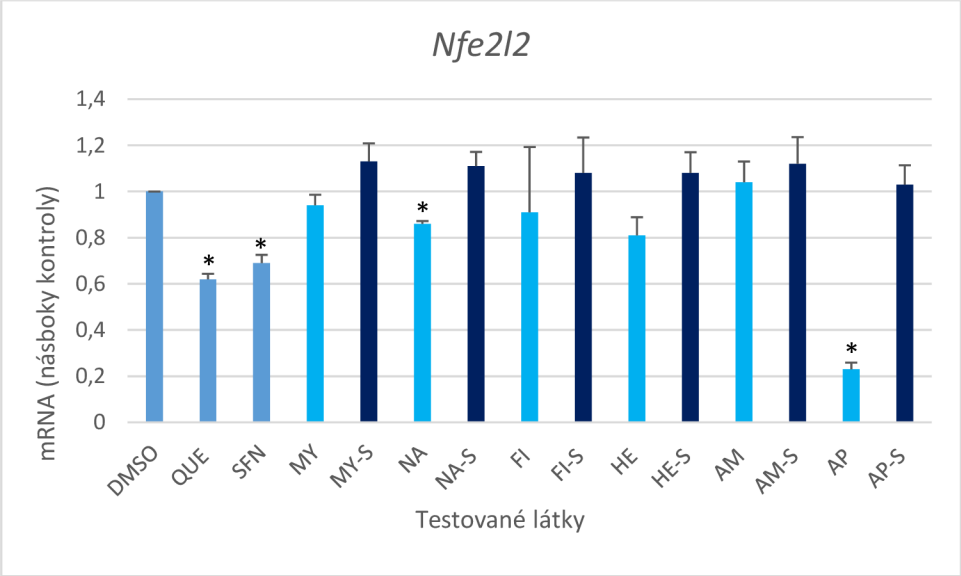


Obrázok 14: Vplyv flavonoidov (50 µM) na expresiu génu *Hmox1*. Doba inkubácie buniek s látkami: 4 hodiny.Pozitívna kontrola: 50 µM kvercetín (QUE) a 5 µM sulforafan (SFN). Použité flavonoidy: myricetín (MY), myricetín-3'-*O*-sulfát (MY-S), naringenín (NA), naringenín-4'-*O*-sulfát (NA-S), fisetín (FI), fisetín-3′-*O*-sulfát (FI-S), hesperetín (HE),

hesperetín-3'-*O*-sulfát (HE-S), ampelopsín (AM), ampelopsín-3'-*O*-sulfát (AM-S), apigenín (AP), apigenín-sulfát (AP-S). *p <0,05- významný rozdiel oproti kontrole.



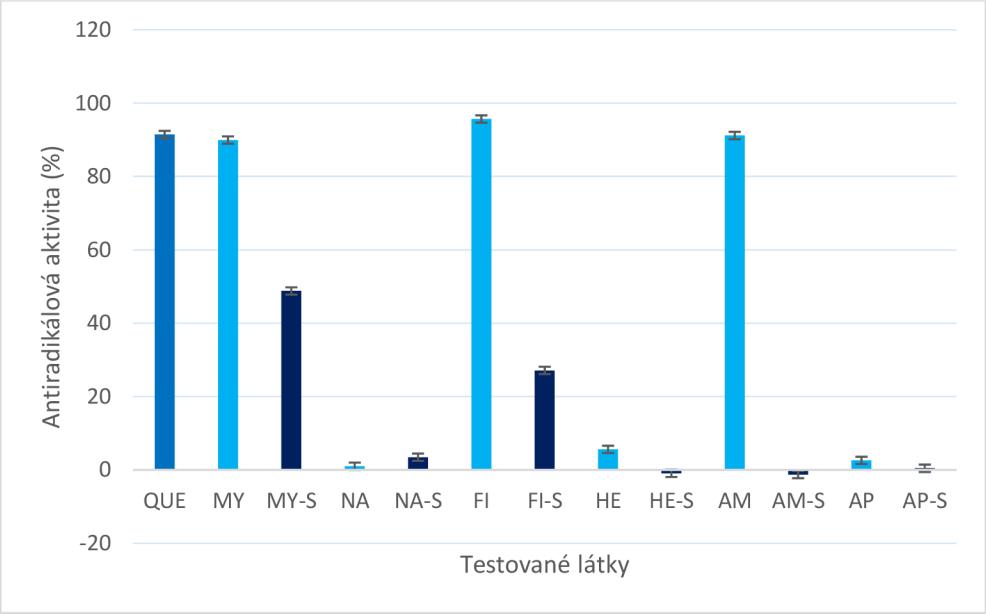
Obrázok 15:Vplyv flavonoidov (50 µM) na expresiu génu *Nqo1*. Doba inkubácie buniek s látkami: 4 hodiny. Pozitívna kontrola: 50 µM kvercetín (QUE) a 5 µM sulforafan (SFN), negatívna kontrola: DMSO. Použité flavonoidy: myricetín (MY), myricetín-3'-*O*-sulfát (MY-S), naringenín (NA), naringenín-4'-*O*-sulfát (NA-S), fisetín (FI), fisetín-3'-*O*-sulfát (FI-S), hesperetín (HE), hesperetín-3'-*O*-sulfát (HE-S), ampelopsín (AM), ampelopsín-3'-*O*-sulfát (AM-S), apigenín (AP), apigenín-4'-*O*-sulfát (AP-S) .*p < 0,05- významný štatistický rozdiel oproti kontrole.



Obrázok 16:Vplyv flavonoidov (50 µM) na indukciu expresie *Nfe2l2*. Doba inkubácie buniek s látkami: 4 hodiny. Pozitívna kontrola: 50 µM kvercetín (QUE) a 5 µM sulforafan (SFN), negatívna kontrola: DMSO. Použité flavonoidy: myricetín (MY), myricetín-3'-*O*-sulfát (MY-S), naringenín (NA), naringenín-4'-*O*-sulfát (NA-S), fisetín (FI), fisetín-3'-*O*-sulfát (FI-S), hesperetín (HE), hesperetín-3'-*O*-sulfát (HE-S), ampelopsín (AM), ampelopsín-3'-*O*-sulfát (AM-S), apígenin (AP), apigenín-4'-*O*-sulfát (AP-S).*p < 0,5 významný štatistický rozdiel oproti kontrole.

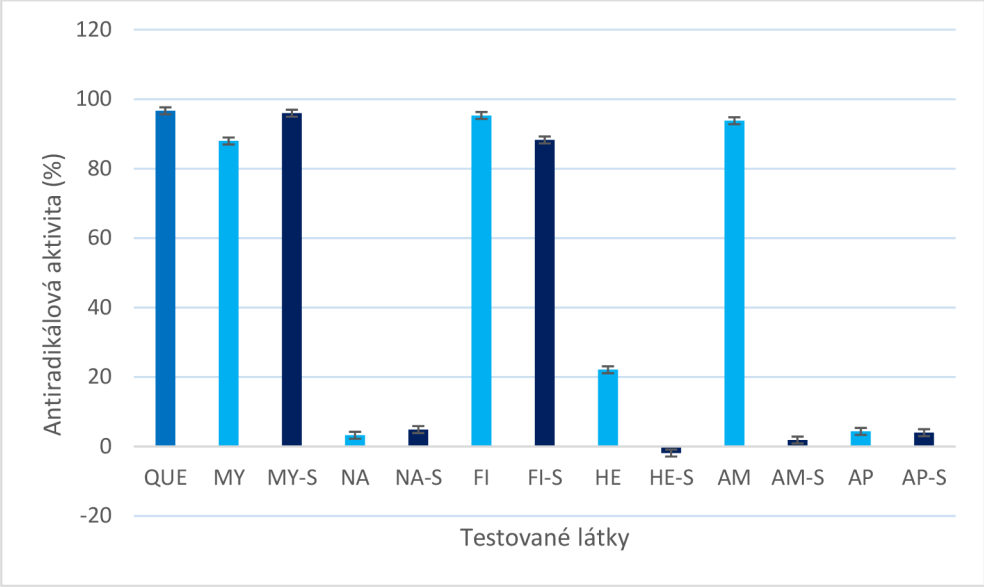
4.3 Zhášanie radikálu DPPH flavonoidmi

Ako poslednú charakteristiku flavonoidov sme skúmali ich antiradikálové účinky, teda nakoľko sú schopné zhášať radikál DPPH. Úbytkom fialového sfarbenia radikálu DPPH bolo možné potvrdiť antiradikálovú činnosť flavonoidov. Pracovali sme s dvoma koncentráciami flavonoidov, 10 a 50 µM (Obr. 17 a 18). Pozitívnu kontrolu v tomto meraní tvoril kvercetín, ktorý preukázal antioxidačné účinky. Pri 10 µM koncentrácií mali najvyššiu antiradikálovú aktivitu fisetin (96 %), ampelopsín (91 %) a myricetín (90 %). Hesperetín zhášal radikál DPPH v malej miere (5,6 %) a ďalšie látky preukázali zanedbateľné hodnoty (Obr. 17). Zo sulfatovaných derivátov v 10 µM koncentrácií vykazovali antioxidačnú aktivititu myricetín-3'-*O*-sulfát (48,78 %) a ampelopsín-3'-*O*-sulfát (11,16 %). Ostatné sulfatované flavonoidy neprejavili významné antiradikálové účinky. Pri 50 µM koncentrácií radikál DPPH so zvýšeným účinkom zhášali fisetín (95,30 %), ampelopsín (94 %) a myricetín (88 %). Prejavil sa účinok hesperetínu (22 %). Naringenín s apigenínom preukázali zanedbateľné hodnoty. Zo sulfatovaných flavonoidov s koncentráciou 50 µM zhášal DPPH radikál myricetín-3'-*O*-sulfát s najvyššou hodnotou (96 %) a fisetín-3'-*O*-sulfát (88%) (Obr. 18). Myricetín a fisetín podľa našich výsledkov boli schopné zhášať radikál DPPH v nesulfatovanej aj sulfatovanej forme. Ostatné sulfatované látky mali veľmi mierne alebo zanedbateľné antiradikálové účinky. Na základe týchto výsledkov môžeme konštatovať antiradikálovú aktivitu u myricetínu, fisetínu a ampelopsínu.



Obrázok 17: Zhášanie DPPH radikálu, pôsobenie flavonoidov na DPPH radikál. Pozitívna kontrola: kvercetín, použité flavonoidy: myricetín (MY), myricetín-3'-*O*-sulfát (MY-S),

naringenín (NA), naringenín-4'-*O*-sulfát (NA-S), fisetín (FI), fisetín-3'-*O*-sulfát (FI-S), hesperetín (HE), hesperetín-3'-*O*-sulfát (HE-S), ampelopsín (AM), ampelopsín-3'-*O*-sulfát (AM-S), apigenin (AP), apigenín-4'-*O*-sulfát (AP-S) Koncentrácia flavonoidov: 10 µM.



Obrázok 18: Zhášanie DPPH radikálu, pôsobenie flavonoidov na DPPH radikál. Pozitívna kontrola: kvercetín, použité flavonoidy: myricetín (MY), myricetín-3'-*O*-sulfát (MY-S), naringenín (NA), naringenín-4'-*O*-sulfát (NA-S), fisetín (FI), fisetín-3'-*O*-sulfát (FI-S), hesperetín (HE), hesperetín-3'-*O*-sulfát (HE-S), ampelopsín (AM), ampelopsín-3'-*O*-sulfát (AM-S), apigenin (AP), apigenín-4'-*O*-sulfát (AP-S). Koncentrácia flavonoidov: 50 µM.

5 DISKUSIA

Cieľom našej práce bolo porovnať biologické účinky flavonoidov a ich sulfatovaných derivátov na bunky. Testované látky predstavovali myricetín, naringenín, fisetín, hesperetín, ampelopsín a apigenín a ich sulfatované deriváty. Sulfatácia je veľmi dôležitým procesom pri biotransformácií xenobiotík a zároveň predstavuje ústrednú reakciu pri biosyntéze a metabolizme viacerých endogénnych biomolekúl. Táto reakcia je katalyzovaná sulfotransferázami a spôsobuje detoxikáciu alebo metabolickú aktiváciu liekov alebo xenobiotík vrátane flavonoidov (Duffel, 2018). Podľa našich meraní môžeme konštatovať, že flavonoidy bez sulfatácie pôsobili na bunky toxicky, pretože s narastajúcou koncentráciou študovaných látok miera viability klesala. Sulfatácia tieto nežiadúce účinky potlačila a viabilita sa tým pádom čiastočne zvýšila. Zo šiestich testovaných látok bol najväčší rozdiel medzi sulfatovanou a nesulfatovanou formou pozorovaný u fisetínu a apigenínu. Tieto látky v sulfatovanej forme významne viabilitu neznižovali. Výsledky tohto experimentu korelovali s hodnotami z predošlej štúdie, v ktorej taktiež sulfatovaný kvercetín nepreukázal toxické účinky voči bunkám. Pre vysvetlenie týchto výsledkov je potrebné poznať biologické pozadie týchto metabolických javov. V spomínanej predošlej štúdií hodnotili aj vstrebávanie flavonoidov a ich sulfatovaných derivátov bunkami. Flavonoid bez sulfatácie bol bunkami absorbovaný lepšie než flavonoid po sulfatácií. Sulfatácia totiž dáva molekule flavonoidu záporný náboj, čím posilňuje jej polaritu a rozpustnosť vo vode. Záporne nabitá molekula sa cez membránu buniek dostáva ťažko, čo vysvetľuje nízky príjem sulfatovaných flavonoidov bunkami (Roubalová *et al.*, 2015). Keďže nami testované flavonoidy po sulfatácií zlepšovali viabilitu buniek, je pravdepodobné, že to bude kvôli nízkej absorpcií týchto látok bunkami, avšak mali by sa vykonať ďalšie štúdie pre potvrdenie týchto vlastností. V konečnom dôsledku sulfatácia na základe našich experimentov spôsobuje zníženie toxických účinkov flavonoidov, čo naznačuje že ich metabolizovaná forma je menej invazívna pre bunky.

Porovnanie pôsobenia flavonoidov a ich sulfatovaných derivátov sme vykonali aj pre indukciu expresie génov *Hmox1* a *Nqo1*. Expresia oboch týchto génov je regulovaná NRF2 a jej indukcia prebieha pri podmienkach oxidatívneho stresu. *Hmox1* kóduje hemoxygenázu 1, cytoprotektívny enzým katalyzujúci premenu hemu na biliverdín, ktorý sa následne mení na bilirubín, ktorý funguje ako antioxidant (Roubalová *et al.*, 2018). *Nqo1* je kódujúcim génom pre NAD(P)H: chinónoxidoreduktázu 1. Ide o cytoplazmatický enzým s antioxidačnou funkciou, tým že zvyšuje hladinu

vnútrobunkového NAD^+ využitím NADH ako donora elektrónov. Takto sa katalyzuje redukcia chinónu na hydrochinón. Bunky sú tým pádom ochránené pred oxidatívnym stresom a poškodením toxickým chinónom (Qui *et al.*, 2022). Z flavonoidov, ktoré sme testovali, fisetín a hesperetín pravdepodobne aktivujú faktor NRF2, čím spôsobujú zvýšenie expresie génu pre hemoxygenázu 1. Expresia génu *Nqo1* nebola významne flavonoidmi ovplyvnená. Fisetín a hesperetín teda na základe našich výsledkov spôsobujú zvýšenie expresie *Hmox1* v podmienkach oxidačného stresu, ktorý môže byť spôsobený oxidáciou týchto látok. Ostatné látky expresiu génov *Hmox1* a *Nqo1* neovplyvnili. Sulfatovaná forma fisetínu a hesperetínu znížila expresiu *Hmox1* v porovnaní s nesulfatovanou formou týchto látok. *Hmox1* je indukovaný v podmienkach oxidačného stresu. Flavonoidy obsahujúce orto-dihydroxy- skupinu sú náchylné na oxidáciu v biologickom prostredí, a paradoxne ich oxidovaná forma môže byť dôvodom indukcie expresie *Hmox1* (Croft *et al.*, 2017). V sulfatovanej forme pravdepodobne flavonoidy nepodliehajú oxidácií a nie je tak potrebná aktivácia tohto génu. Expresia *Nfe2l2*, ktorý kóduje NRF2 sa pôsobením flavonoidov významne nezvýšila. V porovnaní s expresiou *Hmox1* a *Nqo1* ktoré sú NRF2 regulované, to naznačuje, že gén *Hmox1* bol exprimovaný nezávisle od toho, či sa exprimoval *Nfe2l2*. Na aktiváciu NRF2 sú totiž potrebné aktivné kinázy regulované extracelulárnym signálom, ktorý môže byť spustený flavonoidmi, ale neznamená to priamu expresiu génov, ktoré reguluje. Aktivácia transkripcie génu *Hmox1* je omnoho komplexnejšia a zapájajú sa do nej aj dráhy nezávislé od NRF2 (Roubalová *et al*, 2015; Croft *et al.*, 2017).

Podobne ako v našom experimente reagovali aj sulfatované konjugáty kvercetínu, ktoré taktiež neindukovali expresiu génov *Hmox1* a *Nqo1* (Tumova *et al.*, 2019). Príčinou je pravdepodobne už vyššie spomínaná nižšia absorpcia sulfatovaných látok bunkami a ich neschopnosť prechádzať plazmatickou membránou, keďže im chýbajú potrebné transportéry (Tumova *et al.*, 2019). Keď bunka nevstrebáva túto formu látok vo vysokej miere, nie je nutné aby spustila obranné mechanizmy voči oxidačnému stresu.

Keďže sa flavonoidy vyznačujú antiradikálovými vlastnosťami chceli sme porovnať ich vplyv bez a so sulfatovanou skupinou na vychytávanie radikálov. Flavonoidy totiž sami osebe majú schopnosť priamo zhášať reaktívne formy kyslíka. Deje sa to tvorbou koordinančnej väzby voľných radikálov donorovaním atómu vodíka alebo prenosom jedného elektrónu. Okrem toho môžu flavonoidy pôsobiť aj

vnútrobunkovo prostredníctvom inhibície enzýmov vytvárajúcich voľné radikály (Banjarnahor *et al.*, 2014). Podľa našich výsledkov môžeme zhodnotiť, že flavonoidy bez sulfatácie vychytávali radikál DPPH účinnejšie než ich sulfatované deriváty. Aktivita pri zhášaní radikálu DPPH bola preukázaná u myricetínu, fisetínu a ampelopsínu v 10μM a 50 μM koncentrácií. Pri vyššej koncentrácií bol najúčinnejší myricetín-3'-*O*-sulfát zo všetkých testovaných látok. Antiradikálová aktivita fisetín-3'-*O*-sulfátu v 50 μM koncentrácií bola výrazne vyššia než pri 10 μM koncentrácií. Rozdiely v aktivite pri vychytávaní radikálov môžu byť spôsobené rozdielmi v chemickej štruktúre týchto látok. Fisetín a myricetín majú v C kruhu medzi druhým a tretín uhlíkom prítomnú dvojitú väzbu, zatiaľ čo u ostatných flavonoidov okrem ampelopsínu sa táto väzba nenachádza. Znížená antiradikálová aktivita iných flavonoidov teda pravdepodobne súvisí s absenciou dvojitej väzby (Roubalová *et al.*, 2015). Zistili sme, že sulfatácia flavonoidov, konkrétne ich B kruhu indikuje oslabenie antiradikálového účinku flavonoidov, keďže *o*-hydroxyskupina (katechol) je dôležitá pre antiradikálovú aktivitu flavonoidov (Roubalová *et al.*, 2015). Sulfatáciou sa teda znižuje bioaktivita flavonoidov, tým pádom nie sú natoľko schopné vychytávať radikál DPPH. Na pochopenie potenciálneho prínosu sulfatovaných flavonoidov a mechanizmov ich účinku je však potrebný ďalší výskum.

6 ZÁVER

Hlavným cieľom tejto práce bolo porovnanie účinkov dvoch typov flavonoidov, nesulfatovaných a sulfatovaných na základe ich biologického pôsobenia na líniu myších makrofágových buniek. Flavonoidy sú známe hlavne kvôli svojim prínosným vlastnostiam pre ľudské zdravie, keďže ich efektivita bola potvrdená už pri viacerých ochoreniach. Tým aké majú širokospektrálne biologické účinky, tvoria dobrý základ pre prevenciu a liečbu rakoviny. Dokážu inhibovať rast buniek a pôsobia ako protirakovinové látky. Taktiež sú aj nákladovo efektívne. Avšak vo svojej bežnej forme, ako sa už potvrdilo pri viacerých výskumoch, vykazujú cytotoxické účinky v prostredí živého organizmu. Metabolizovanie flavonoidov by však mohlo tieto vlastnosti zmierniť a flavonoidy v ich metabolizovanej forme by sa mohli využívať ako účinná forma bioaktívnych látok.

Účelom tejto práce bolo skúmať vlastnosti flavonoidov po ich pôsobení na myšie makrofágy. Konkrétne sme pracovali s myricetínom, naringenínom, fisetínom, hesperetínom, ampelopsínom a apigenínom a ich sulfatovanými derivátmi. Najprv sme zisťovali ich cytotoxicitu pomocou MTT testu aplikovaním flavonoidov v istom rozpätí koncentrácií. Bol potvrdený náš predpoklad, že v sulfatovanej forme určité flavonoidy znižovali cytotoxický účinok voči bunkám. Následne sme zisťovali ich vplyv na dráhu transkripčného faktora NRF2 a to zmeraním indukcie expresie dvoch konkrétnych génov, ktoré sú pod kontrolou tohto faktora. Na to sme použili qPCR. Zamerali sme sa aj na ich antioxidačné účinky, kde sme testovali zhášanie radikálu DPPH flavonoidy a ich sulfatovanými derivátmi.

Pri skúmaní reakcie buniek na oxidačný stres spôsobený cytotoxicitou nemetabolizovaných flavonoidov sme zistili zvýšenie indukcie expresie *HMOX1* pôsobením fisetinu a hesperetinu. Sulfatovaná forma týchto látok však indukciu expresie znižovala. V prípade génu *NQO1* sme nezaznamenali vplyv flavonoidov na expresiu. Z toho môžeme odvodiť, že sulfatované flavonoidy stresovali bunky menej než ich normálna forma, keďže flavonoidy po sulfatácií pravdepodobne nie sú bunkami natoľko absorbované. V rámci skúmania antioxidačných účinkov týchto prírodných látok môžeme konštatovať, že flavonoidy bez sulfatácie vychytávajú radikály efektívnejšie než sulfatované flavonoidy. Rozdiely v antioxidačnej aktivite boli aj medzi jednotlivými látkami, čo odkazuje na prítomnosť alebo neprítomnosť dvojitej väzby v C kruhu flavonoidov. Flavonoidy po sulfatácií zas majú oslabený antiradikálový účinok,

preto nie sú natoľko schopné vychytávať radikály. Na potvrdenie našich výsledkov a vytvorenie viac uceleného pohľadu sú však potrebné ďalšie experimenty.

7 LITERATÚRA

A. Filipa Almeida, Santos, C. N., & M. Rita Ventura. (2017). Synthesis of New Sulfated and Glucuronated Metabolites of Dietary Phenolic Compounds Identified in Human Biological Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *65*(31), 6460–6466. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b05629

Al-Horani, R. A., & Desai, U. R. (2010). Chemical sulfation of small molecules—advances and challenges. *Tetrahedron*, *66*(16), 2907–2918. https://doi.org/10.1016/j.tet.2010.02.015

Almeida, A. F., Borge, G. I. A., Piskula, M., Tudose, A., Tudoreanu, L., Valentová, K., Williamson, G., & Santos, C. N. (2018). Bioavailability of Quercetin in Humans with a Focus on Interindividual Variation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *17*(3), 714–731. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12342

Alqurashi, R. M., Galante, L. A., Rowland, I. R., Spencer, J. P., & Commane, D. M. (2016). Consumption of a flavonoid-rich açai meal is associated with acute improvements in vascular function and a reduction in total oxidative status in healthy overweight men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *104*(5), 1227–1235. https://doi.org/10.3945/ajcn.115.128728

Alseekh, S., Perez de Souza, L., Benina, M., & Fernie, A. R. (2020). The style and substance of plant flavonoid decoration; towards defining both structure and function. *Phytochemistry*, *174*, 112347. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112347

Alzand., I. K., & Mohamed, A. M. (2012). Flavonoids: chemistry, biochemistry and antioxidant activity. *J Pharm Res*, *5*, 4013-20.

Anzenbacher, P., & Anzenbacherová, E. (2001). Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *58*(5), 737–747. https://doi.org/10.1007/pl00000897

Ashihara, H., Crozier, A., & Atsushi Komamine. (2011). Plant Metabolism and Biotechnology. *Wiley EBooks*. https://doi.org/10.1002/9781119991311

Banjarnahor, S. D. S., & Artanti, N. (2014). Antioxidant properties of flavonoids. *Medical Journal of Indonesia*, *23*(4), 239–244. https://doi.org/10.13181/mji.v23i4.1015

Barron, D., Varin, L., Ibrahim, R. K., Harborne, J. B., & Williams, C. A. (1988). Sulphated flavonoids—an update. *Phytochemistry*, *27*(8), 2375–2395. https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)87003-1

Beking, K., & Vieira, A. (2010). Flavonoid intake and disability-adjusted life years due to Alzheimer's and related dementias: a population-based study involving twenty-three developed countries. *Public Health Nutrition*, *13*(9), 1403–1409. https://doi.org/10.1017/s1368980009992990

Birchfield, A. S., & McIntosh, C. A. (2020). Metabolic engineering and synthetic biology of plant natural products – A minireview. *Current Plant Biology*, *24*, 100163. https://doi.org/10.1016/j.cpb.2020.100163

Bohm, B.A. & Stuessy, T.F. (2001). *Flavonoids of the Sunflower Family (Asteraceae)*. 1st edition, Springer Science & Business Media: Wien, 890 strán.

Bordenave, N., Hamaker, B. R., & Ferruzzi, M. G. (2014). Nature and consequences of non-covalent interactions between flavonoids and macronutrients in foods. *Food Funct.*, *5*(1), 18–34. https://doi.org/10.1039/c3fo60263j

Boubakeur, B., Tirtouil, A., Meddah, B., & Khadem, H. (2015). The evaluation of the effect of synthetic flavonoids on growth of pathogenic and probiotic bacteria. *J. Chem. Pharm. Res*, *7*(10), 228-236.

Brahem, M., Renard, C. M. G. C., Eder, S., Loonis, M., Ouni, R., Mars, M., & Le Bourvellec, C. (2017). Characterization and quantification of fruit phenolic compounds of European and Tunisian pear cultivars. *Food Research International*, *95*, 125–133. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.03.002

Brand, W., Boersma, M. G., Bik, H., Hil, E. F. H. den, Vervoort, J., Barron, D., Meinl, W., Glatt, H., Williamson, G., Bladeren, P. J. van, & Rietjens, I. M. C. M. (2010). Phase II Metabolism of Hesperetin by Individual UDP-Glucuronosyltransferases and Sulfotransferases and Rat and Human Tissue Samples. *Drug Metabolism and*

Disposition, *38*(4), 617–625. https://doi.org/10.1124/dmd.109.031047
Brazier-Hicks, M., Evans, K. M., Gershater, M. C., Puschmann, H., Steel, P. G., & Edwards, R. (2009). The C-Glycosylation of Flavonoids in Cereals. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(27), 17926–17934. https://doi.org/10.1074/jbc.m109.009258
Brodsky, K., Káňová, K., Konvalinková, D., Slámová, K., Pelantová, H., Valentová, K., Bojarová, P., Křen, V., & Petrásková, L. (2022). Bacterial Aryl Sulfotransferases in Selective and Sustainable Sulfation of Biologically Active Compounds using Novel Sulfate Donors. *ChemSusChem*, *15*(18). https://doi.org/10.1002/cssc.202201253
Buckingham, J. & Munasinghe, V. R. N.(2015) *Dictionary of Flavonoids*. 1st edition, CRC Press: Boca Raton, FL, 1031 strán.
Cassidy, A., & Minihane, A.-M. (2016). The role of metabolism (and the microbiome) in defining the clinical efficacy of dietary flavonoids. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *105*(1), 10–22. https://doi.org/10.3945/ajcn.116.136051
Castell, M., J. Perez-Cano, F., Abril-Gil, M., & Franch, A. (2014). Flavonoids on Allergy. *Current Pharmaceutical Design*, *20*(6), 973–987. https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cpd/2014/00000020/00000006/art00017
Chen, Z., Zheng, S., Li, L., & Jiang, H. (2014). Metabolism of Flavonoids in Human: A Comprehensive Review. *Current Drug Metabolism*, *15*(1), 48–61. https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cdm/2014/00000015/00000001/art00007
Chorley, B. N., Campbell, M. R., Wang, X., Karaca, M., Sambandan, D., Bangura, F., Xue, P., Pi, J., Kleeberger, S. R., & Bell, D. A. (2012). Identification of novel NRF2-regulated genes by ChIP-Seq: influence on retinoid X receptor alpha. *Nucleic Acids Research*, *40*(15), 7416–7429. https://doi.org/10.1093/nar/gks409
Čižmárová, B., Hubková, B., Tomečková, V., & Birková, A. (2023). Flavonoids as Promising Natural Compounds in the Prevention and Treatment of Selected Skin Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(7), 6324. https://doi.org/10.3390/ijms24076324
Correia-da-Silva, M., Sousa, E., & Pinto, M. M. M. (2013). Emerging Sulfated Flavonoids and other Polyphenols as Drugs: Nature as an Inspiration. *Medicinal Research Reviews*, *34*(2), 223–279. https://doi.org/10.1002/med.21282
Croft, K. D., Zhang, D., Jiang, R., Ayer, A., Shengule, S., Payne, R. J., Ward, N. C., & Stocker, R. (2017). Structural requirements of flavonoids to induce heme oxygenase-1 expression. *Free Radical Biology & Medicine*, *113*, 165–175. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.09.030
Crozier, A., Del Rio, D., & Clifford, M. N. (2010). Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine*, *31*(6), 446–467. https://doi.org/10.1016/j.mam.2010.09.007
Cserhati, T., Forgács, E., & Morais, M. H. (2000). *Liquid chromatography of natural pigments*. Biomedical chromatography : BMC. https://doi.org/10.1002/1099-0801(200008)14:5%3C281::AID-BMC3%3E3.0.CO;2-O
Davidian, J. C., & Kopriva, S. (2010). Regulation of sulfate uptake and assimilation—the same or not the same?. *Molecular plant*, *3*(2), 314-325.
de Graffenried, C. L., & Bertozzi, C. R. (2003). Golgi Localization of Carbohydrate Sulfotransferases Is a Determinant of L-selectin Ligand Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(41), 40282–40295. https://doi.org/10.1074/jbc.m304928200
Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P. E., Tognolini, M., Borges, G., & Crozier, A. (2013). Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, *18*(14), 1818–1892. https://doi.org/10.1089/ars.2012.4581
Demyttenaere, J.; Poppe, J. (2004*). In Renewable Bioresources Scope and Modification for Non-food Applications.* 1st edition, John Wiley & Sons: Chichester, 310 strán
Dias, M. C., Pinto, D. C. G. A., & Silva, A. M. S. (2021). Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity. *Molecules*, *26*(17), 5377. https://doi.org/10.3390/molecules26175377
Dixon, R. A., & Steele, C. L. (1999). Flavonoids and isoflavonoids – a gold mine for metabolic

engineering. *Trends in Plant Science*, *4*(10), 394–400. https://doi.org/10.1016/s1360-1385(99)01471-5

Dueñas, M., González-Manzano, S., Surco-Laos, F., González-Paramas, A., & Santos-Buelga, C. (2012). Characterization of Sulfated Quercetin and Epicatechin Metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(14), 3592–3598. https://doi.org/10.1021/jf2050203

Duffel, M. W. (2010). Sulfotransferases. *Www.sciencedirect.com*, *4*, 367–384. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00418-8

Dunstan, M. S., Robinson, C. J., Jervis, A. J., Yan, C., Carbonell, P., Hollywood, K. A., Currin, A., Swainston, N., Feuvre, R. L., Micklefield, J., Faulon, J.-L., Breitling, R., Turner, N., Takano, E., & Scrutton, N. S. (2020). Engineering Escherichia coli towards de novo production of gatekeeper (2S)-flavanones: naringenin, pinocembrin, eriodictyol and homoeriodictyol. *Synthetic Biology*, *5*(1). https://doi.org/10.1093/synbio/ysaa012

Durga, M., Nathiya, S., & Devanesa, T. (2014). *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. Www.ijpbs.net. http://www.ijpbs.net/cms/php/upload/3377

Enerstvedt, K. H., Jordheim, M., & Andersen, Ø. M. (2016). Isolation and Identification of Flavonoids Found in Zostera marina Collected in Norwegian Coastal Waters. *American Journal of Plant Sciences*, *07*(07), 1163–1172. https://doi.org/10.4236/ajps.2016.77111

Faggio, C., Sureda, A., Morabito, S., Sanches-Silva, A., Mocan, A., Nabavi, S. F., & Nabavi, S. M. (2017). Flavonoids and platelet aggregation: A brief review. *European Journal of Pharmacology*, *807*, 91–101. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.04.009

Fernandes, I., Pérez-Gregorio, R., Soares, S., Mateus, N., & De Freitas, V. (2017). Wine Flavonoids in Health and Disease Prevention. *Molecules*, *22*(2), 292. https://doi.org/10.3390/molecules22020292

Forman, H. J., & Ursini, F. (2014). Para-hormesis: An innovative mechanism for the health protection brought by antioxidants in wine. *Nutrition and Aging*, *2*(2,3), 117–124. https://doi.org/10.3233/nua-130033

Forman, H. J., Davies, K. J. A., & Ursini, F. (2014). How do nutritional antioxidants really work: nucleophilic tone and para-hormesis versus free radical scavenging in vivo. *Free Radical Biology & Medicine*, *66*, 24–35. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.045

Gan, R.-Y., Chan, C.-L., Yang, Q.-Q., Li, H.-B., Zhang, D., Ge, Y.-Y., Gunaratne, A., Ge, J., & Corke, H. (2019). Bioactive compounds and beneficial functions of sprouted grains. *Sprouted Grains*, 191–246. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811525-1.00009-9

Gigolashvili, T., & Kopriva, S. (2014). Transporters in plant sulfur metabolism. *Frontiers in Plant Science*, *5*(442). https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00442

Gill, D. M., Male, L., & Jones, A. M. (2019). Sulfation made simple: a strategy for synthesising sulfated molecules. *Chemical Communications*, *55*(30), 4319–4322. https://doi.org/10.1039/c9cc01057b

Glatt, H. (2000). Sulfotransferases in the bioactivation of xenobiotics. *Chemico-Biological Interactions*, *129*(1-2), 141–170. https://doi.org/10.1016/s0009-2797(00)00202-7

Gomes, V., Torres, C., Rodríguez-Borges, J. E., & Fátima Paiva-Martins. (2015). A Convenient Synthesis of Hydroxytyrosol Monosulfate Metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(43), 9565–9571. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04307

Guglielmone, H. A., Agnese, A. M., Núñez Montoya, S. C., & Cabrera, J. L. (2005). Inhibitory effects of sulphated flavonoids isolated from Flaveria bidentis on platelet aggregation. *Thrombosis Research*, *115*(6), 495–502. https://doi.org/10.1016/j.thromres.2004.11.019

Gunnarsson, G. T., & Desai, U. R. (2002). Interaction of Designed Sulfated Flavanoids with Antithrombin: Lessons on the Design of Organic Activators. *Journal of Medicinal Chemistry*, *45*(20), 4460–4470. https://doi.org/10.1021/jm020132y

Gurni, A. A., König, W. A., & Klaus Kubitzki. (1981). Flavonoid glycosides and sulphates from the dilleniaceae. *Phytochemistry*, *20*(5). https://doi.org/10.1016/0031-9422(81)83026-9

Haraguchi, H., Isao Ohmi, Sakai, S., Fukuda, A., Toihara, Y., Fujimoto, T., Okamura, N., & Yagi, A. (1996). Effect of *Polygonum hydropiper* Sulfated Flavonoids on Lens Aldose

Reductase and Related Enzymes. *Journal of Natural Products*, *59*(4), 443–445. https://doi.org/10.1021/np9601622

Harborne, J. B. (1967). Comparative biochemistry of the flavonoids-IV. *Phytochemistry*, *6*(10), 1415–1428. https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)82884-8

Harborne, J. B. (1975). Flavonoid sulphates: A new class of sulphur compounds in higher plants. *Phytochemistry*, *14*(5-6), 1147–1155. https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)98585-6

Harborne, J. B. (1988).*The Flavonoid: Advances in Research Since 1980*. 1st edition Springer Science+Business Media: Dordrecht, Netherlands, 620 strán.

Harborne, J. B., & Baxter, H. (1999). *The handbook of natural flavonoids*. English Book UK.

Harborne, J. B., & Baxter, H. (1999). *The handbook of natural flavonoids*. 1st and 2nd edition. English Book UK. (pp. xiii+-889).

Harborne, J. B., & Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, *55*(6), 481–504. https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)00235-1

Hayasaka, N., Shimizu, N., Komoda, T., Mohri, S., Tsushida, T., Eitsuka, T., Miyazawa, T., & Nakagawa, K. (2018). Absorption and Metabolism of Luteolin in Rats and Humans in Relation to in Vitro Anti-inflammatory Effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *66*(43), 11320–11329. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03273

Hayes, J. D., & Dinkova-Kostova, A. T. (2014). The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends in Biochemical Sciences*, *39*(4), 199–218. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.02.002

He, C. H., Gong, P., Hu, B., Stewart, D., Choi, M. E., Choi, A. M. K., & Alam, J. (2001). Identification of Activating Transcription Factor 4 (ATF4) as an Nrf2-interacting Protein: IMPLICATION FOR HEME OXYGENASE-1 GENE REGULATION *. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(24), 20858–20865. https://doi.org/10.1074/jbc.M101198200

He, F., Ru, X., & Wen, T. (2020). NRF2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(13). https://doi.org/10.3390/ijms21134777

Hell, R. (1997). Molecular physiology of plant sulfur metabolism. *Planta*, *202*(2), 138–148. http://www.jstor.org/stable/23384959

Hiroshi Ashihara, Crozier, A., & Atsushi Komamine. (2011). Plant Metabolism and Biotechnology. *Wiley EBooks*. https://doi.org/10.1002/9781119991311

Hirschmann, F., Krause, F., & Papenbrock, J. (2014). The multi-protein family of sulfotransferases in plants: composition, occurrence, substrate specificity, and functions. *Frontiers in Plant Science*, *5*(556). https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00556

Hodek, P., Trefil, P., & Stiborová, M. (2002). Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-Biological Interactions*, *139*(1), 1–21. https://doi.org/10.1016/s0009-2797(01)00285-x

Hwang, E. J., Kaneko, M., Yasuo Ohnishi, & Sueharu Horinouchi. (2003). Production of Plant-Specific Flavanones by *Escherichia coli* Containing an Artificial Gene Cluster. *Appl Environ Microbiol*, *69*(5), 2699–2706. https://doi.org/10.1128/aem.69.5.2699-2706.2003

Imrad, M., Rauf, A., Abu-Izneid, T., Nadeem, M., Shariati, M. A., Khan, I. A., Imran, A., Orhan, I. E., Rizwan, M., & Atif, M. (2019). Luteolin, a flavonoid, as an anticancer agent: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *112*, 108612. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108612

Inoue-Choi, M., Yuan, J.-M., Yang, C. S., Van Den Berg, D. J., Lee, M.-J., Gao, Y.-T., & Yu, M. C. (2010). Genetic Association Between the COMT Genotype and Urinary Levels of Tea Polyphenols and Their Metabolites among Daily Green Tea Drinkers. *International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics*, *1*(2), 114–123. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3010377/

Ionita, P. (2021). The Chemistry of DPPH· Free Radical and Congeners. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(4), 1545. https://doi.org/10.3390/ijms22041545

Iwashina, T. (2003). Flavonoid Function and Activity to Plants and Other Organisms.

Biological Sciences in Space, *17*(1), 24–44. https://doi.org/10.2187/bss.17.24

Iwashina, T. (2015). Contribution to Flower Colors of Flavonoids Including Anthocyanins: A Review. *Natural Product Communications*, *10*(3), 1934578X1501000. https://doi.org/10.1177/1934578x1501000335

Iwashina, T., & Mizuno, T. (2020). Flavonoids and Xanthones From the Genus*Iris*: Phytochemistry, Relationships with Flower Colors and Taxonomy, and Activities and Function. *Natural Product Communications*, *15*(10), 1934578X2093715. https://doi.org/10.1177/1934578x20937151

Jancova, P., Anzenbacher, P., & Anzenbacherova, E. (2010). Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, *154*(2), 103–116. https://doi.org/10.5507/bp.2010.017

Jaramillo, M. C., & Zhang, D. D. (2013). The emerging role of the Nrf2-Keap1 signaling pathway in cancer. *Genes & Development*, *27*(20), 2179–2191. https://doi.org/10.1101/gad.225680.113

Jennings, A., MacGregor, A., Spector, T., & Cassidy, A. (2017). Higher dietary flavonoid intakes are associated with lower objectively measured body composition in women: evidence from discordant monozygotic twins. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *105*(3), 626–634. https://doi.org/10.3945/ajcn.116.144394

Jurd, L. (1962). The chemistry of flavonoid compounds. *by TA Geissman, Pergamon Press, Oxford*, 107.

Káňová, K., Petrásková, L., Pelantová, H., Zuzana Rybková, Kateřina Malachová, Cvačka, J., Vladimír Křen, & Kateřina Valentová. (2020). Sulfated Metabolites of Luteolin, Myricetin, and Ampelopsin: Chemoenzymatic Preparation and Biophysical Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *68*(40), 11197–11206. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c03997

Kerins, M. J., & Ooi, A. (2018). The Roles of NRF2 in Modulating Cellular Iron Homeostasis. *Antioxidants & Redox Signaling*, *29*(17), 1756–1773. https://doi.org/10.1089/ars.2017.7176

Kim, B. G., Yang, S. M., Kim, S. Y., Cha, M. N., & Ahn, J.-H. (2015). Biosynthesis and production of glycosylated flavonoids in Escherichia coli: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *99*(7), 2979–2988. https://doi.org/10.1007/s00253-015-6504-6

Kjersti Hasle Enerstvedt, Jordheim, M., & Andersen, Ø. M. (2016). Isolation and Identification of Flavonoids Found in Zostera marina Collected in Norwegian Coastal Waters. *American Journal of Plant Sciences*, *07*(07), 1163–1172. https://doi.org/10.4236/ajps.2016.77111

Kolaříková, V., Brodsky, K., Petrásková, L., Pelantová, H., Cvačka, J., Libor Havlíček, Vladimír Křen, & Kateřina Valentová. (2022). Sulfation of Phenolic Acids: Chemoenzymatic vs. Chemical Synthesis. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(23), 15171–15171. https://doi.org/10.3390/ijms232315171

Kozlowska, A., & Szostak-Wegierek, D. (2014). Flavonoids - food sources and health benefits. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, *65*(2). https://agro.icm.edu.pl/agro/element/bwmeta1.element.agro-a162625a-4ae7-4ae3-b06e-a3deb6803b03

Kruger, M. J., Davies, N., Myburgh, K. H., & Lecour, S. (2014). Proanthocyanidins, anthocyanins and cardiovascular diseases. *Food Research International*, *59*, 41–52. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.046

Kwak, J. W., Seok, J.-H., Suh, H., Choi, Y., Hong, S., Kim, D.-H., & Yong Chool Boo. (2016). Antimelanogenic effects of luteolin 7-sulfate isolated from*Phyllospadix iwatensis*Makino. *British Journal of Dermatology*, *175*(3), 501–511. https://doi.org/10.1111/bjd.14496

Lampe, J., & Chang, J. (2007). Interindividual differences in phytochemical metabolism and disposition. *Seminars in Cancer Biology*, *17*(5), 347–353. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2007.05.003

Levisson, M., Patinios, C., Hein, S., de Groot, P. A., Daran, J.-M., Hall, R. D., Martens, S., &

Beekwilder, J. (2018). Engineering de novo anthocyanin production in Saccharomyces cerevisiae. *Microbial Cell Factories*, *17*(1). https://doi.org/10.1186/s12934-018-0951-6

Li, J., Tian, C., Xia, Y., Mutanda, I., Wang, K., & Wang, Y. (2019). Production of plant-specific flavones baicalein and scutellarein in an engineered E. coli from available phenylalanine and tyrosine. *Metabolic Engineering*, *52*, 124–133. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.11.008

Liu, C., Yang, C., Hwang, S., Ferraro, S. L., Flynn, J. P., & Niu, J. (2020). A General Approach to *O*-Sulfation by a Sulfur(VI) Fluoride Exchange Reaction. *Angewandte Chemie International Edition*, *59*(42), 18435–18441. https://doi.org/10.1002/anie.202007211

Liu, Y., Lien, I-Feh. F., Ruttgaizer, S., Dove, P., & Taylor, S. D. (2003). Synthesis and Protection of Aryl Sulfates Using the 2,2,2-Trichloroethyl Moiety. *Organic Letters*, *6*(2), 209–212. https://doi.org/10.1021/ol036157o

Lou, H., Hu, L., Lu, H., Wei, T., & Chen, Q. (2021). Metabolic Engineering of Microbial Cell Factories for Biosynthesis of Flavonoids: A Review. *Molecules*, *26*(15), 4522. https://doi.org/10.3390/molecules26154522

Lv, Y., Marsafari, M., Koffas, M., Zhou, J., & Xu, P. (2019). Optimizing Oleaginous Yeast Cell Factories for Flavonoids and Hydroxylated Flavonoids Biosynthesis. *ACS Synthetic Biology*, *8*(11), 2514–2523. https://doi.org/10.1021/acssynbio.9b00193

Ma, L. Y., Liu, R. H., Xu, X. D., Yu, M. Q., Zhang, Q., & Liu, H. L. (2010). The pharmacokinetics of C-glycosyl flavones of Hawthorn leaf flavonoids in rat after single dose oral administration. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, *17*(8-9), 640–645. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.12.010

Mackenzie, P. I., Walter Bock, K., Burchell, B., Guillemette, C., Ikushiro, S., Iyanagi, T., Miners, J. O., Owens, I. S., & Nebert, D. W. (2005). Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily. *Pharmacogenetics and Genomics*, *15*(10), 677–685. https://doi.org/10.1097/01.fpc.0000173483.13689.56

Maestro, A., Terdoslavich, M., Vanzo, A., Kuku, A., Tramer, F., Nicolin, V., Micali, F., Decorti, G., & Passamonti, S. (2009). Expression of bilitranslocase in the vascular endothelium and its function as a flavonoid transporter. *Cardiovascular Research*, *85*(1), 175–183. https://doi.org/10.1093/cvr/cvp290

Manach, C., & Donovan, J. L. (2004). Pharmacokinetics and Metabolism of Dietary Flavonoids in Humans. *Free Radical Research*, *38*(8), 771–785. https://doi.org/10.1080/10715760410001727858

Marín, L., Gutiérrez-del-Río, I., Entrialgo-Cadierno, R., Villar, C. J., & Lombó, F. (2018). De novo biosynthesis of myricetin, kaempferol and quercetin in Streptomyces albus and Streptomyces coelicolor. *PLOS ONE*, *13*(11), e0207278. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207278

Marzocchella, L., Fantini, M., Benvenuto, M., Masuelli, L., Tresoldi, I., Modesti, A., & Bei, R. (2011). Dietary Flavonoids: Molecular Mechanisms of Action as Anti- Inflammatory Agents. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, *5*(3), 200–220. https://doi.org/10.2174/187221311797264937

Menezes, J. C. J. M. D. S., Orlikova, B., Morceau, F., & Diederich, M. (2015). Natural and Synthetic Flavonoids: Structure–Activity Relationship and Chemotherapeutic Potential for the Treatment of Leukemia. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *56*(sup1), S4–S28. https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1074532

Merken, H. M., & Beecher, G. R. (2000). Measurement of Food Flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography: A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(3), 577–599. https://doi.org/10.1021/jf990872o

Mfotie Njoya, E. (2021). Medicinal plants, antioxidant potential, and cancer. *Cancer*, 349–357. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819547-5.00031-6

Nakano, H., Ogura, K., Takahashi, E., Harada, T., Nishiyama, T., Muro, K., Hiratsuka, A., Kadota, S., & Watabe, T. (2004). Regioselective Monosulfation and Disulfation of the Phytoestrogens Daidzein and Genistein by Human Liver Sulfotransferases. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, *19*(3), 216–226.

https://doi.org/10.2133/dmpk.19.216
Needs, P. W., & Kroon, P. A. (2006). Convenient syntheses of metabolically important quercetin glucuronides and sulfates. *Tetrahedron*, *62*(29), 6862–6868. https://doi.org/10.1016/j.tet.2006.04.102
Neuhouser, M. L. (2004). Review: Dietary Flavonoids and Cancer Risk: Evidence From Human Population Studies. *Nutrition and Cancer*, *50*(1), 1–7. https://doi.org/10.1207/s15327914nc5001_1
Nigam, S. K., Bush, K. T., Martovetsky, G., Ahn, S.-Y., Liu, H. C., Richard, E., Bhatnagar, V., & Wu, W. (2015). The Organic Anion Transporter (OAT) Family: A Systems Biology Perspective. *Physiological Reviews*, *95*(1), 83–123. https://doi.org/10.1152/physrev.00025.2013
Nowell, S., & Falany, C. N. (2006). Pharmacogenetics of human cytosolic sulfotransferases. *Oncogene*, *25*(11), 1673–1678. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209376
Op de Beck, P., Cartier, G., David, B., Dijoux-Franca, M.-G., & Mariotte, A.-M. (2003). Antioxidant flavonoids and phenolic acids from leaves of Leea guineense G. Don (Leeaceae). *Phytotherapy Research*, *17*(4), 345–347. https://doi.org/10.1002/ptr.1141
Otake, Y., & Walle, T. (2002). Oxidation of the Flavonoids Galangin and Kaempferide by Human Liver Microsomes and CYP1A1, CYP1A2, and CYP2C9. *Drug Metabolism and Disposition*, *30*(2), 103–105. https://doi.org/10.1124/dmd.30.2.103
Otake, Y., Hsieh, F., & Walle, T. (2002). Glucuronidation versus Oxidation of the Flavonoid Galangin by Human Liver Microsomes and Hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition*, *30*(5), 576–581. https://doi.org/10.1124/dmd.30.5.576
Pai, T. Govind., Suiko, M., Sakakibara, Y., & Liu, M.-C. (2001). Sulfation of Flavonoids and Other Phenolic Dietary Compounds by the Human Cytosolic Sulfotransferases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *285*(5), 1175–1179. https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5316
Pal, D., & Verma, P. (2013). *FLAVONOIDS: A POWERFUL AND ABUNDANT SOURCE OF ANTIOXIDANTS*. https://web.archive.org/web/20180413072927id_/http://ijppsjournal.com/Vol5Issue3/7048.pdf
Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, *5*(e47). https://doi.org/10.1017/jns.2016.41
Pandey, R. P., Parajuli, P., Koffas, M. A. G., & Sohng, J. K. (2016). Microbial production of natural and non-natural flavonoids: Pathway engineering, directed evolution and systems/synthetic biology. *Biotechnology Advances*, *34*(5), 634–662. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.02.012
Passamonti, S., Vrhovsek, U., Vanzo, A., & Mattivi, F. (2003). The stomach as a site for anthocyanins absorption from food. *FEBS Letters*, *544*(1), 210–213. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00504-0
Pathak, N., Khan, S., Bhargava, A., Raghuram, G. V., Jain, D., Panwar, H., Samarth, R. M., Jain, S. K., Maudar, K. K., Mishra, D. K., & Mishra, P. K. (2014). Cancer chemopreventive effects of the flavonoid-rich fraction isolated from papaya seeds. *Nutrition and Cancer*, *66*(5), 857–871. https://doi.org/10.1080/01635581.2014.904912
Peluso, I., Raguzzini, A., & Serafini, M. (2013a). Effect of flavonoids on circulating levels of TNF-α and IL-6 in humans: A systematic review and meta-analysis. *Molecular Nutrition & Food Research*, *57*(5), 784–801. https://doi.org/10.1002/mnfr.201200721
Peluso, I., Raguzzini, A., & Serafini, M. (2013b). Effect of flavonoids on circulating levels of TNF-α and IL-6 in humans: A systematic review and meta-analysis. *Molecular Nutrition & Food Research*, *57*(5), 784–801. https://doi.org/10.1002/mnfr.201200721
Phanstiel IV, O., & Tschammer, N. (2017). *U.S. Patent No. 9,629,822*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
Pimpão, R. C., Ventura, M. R., Ferreira, R. B., Williamson, G., & Santos, C. N. (2015). Phenolic sulfates as new and highly abundant metabolites in human plasma after ingestion of a mixed berry fruit purée. *The British Journal of Nutrition*, *113*(3), 454–463. https://doi.org/10.1017/S0007114514003511

Plaza, M., Pozzo, T., Liu, J., Gulshan Ara, K. Z., Turner, C., & Nordberg Karlsson, E. (2014). Substituent Effects on in Vitro Antioxidizing Properties, Stability, and Solubility in Flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(15), 3321–3333. https://doi.org/10.1021/jf405570u

Purchartová, K., Valentová, K., Pelantová, H., Petr Marhol, Cvačka, J., Libor Havlíček, Křenková, A., Vavříková, E., Biedermann, D., & Chambers, C. S. (2015). Prokaryotic and Eukaryotic Aryl Sulfotransferases: Sulfation of Quercetin and Its Derivatives. *International Journal of Molecular Sciences*, *7*(19), 3152–3162. https://doi.org/10.1002/cctc.201500298

Qiu, D., Song, S., Wang, Y., Bian, Y., Wu, M., Wu, H., Shi, Y., & Duan, H. (2022). NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 attenuates oxidative stress and apoptosis by regulating Sirt1 in diabetic nephropathy. *Journal of Translational Medicine*, *20*, 44. https://doi.org/10.1186/s12967-021-03197-3

Raffa, D., Maggio, B., Raimondi, M. V., Plescia, F., & Daidone, G. (2017). Recent discoveries of anticancer flavonoids. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *142*, 213–228. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.07.034

Raghuraman, A., Riaz, M., Hindle, M., & Desai, U. R. (2007). Rapid and efficient microwave-assisted synthesis of highly sulfated organic scaffolds. *Tetrahedron Letters*, *48*(38), 6754–6758. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2007.07.100

Riches, Z., Stanley, E., Bloomer, J. C., & Michael W.H. Coughtrie. (2009). Quantitative Evaluation of the Expression and Activity of Five Major Sulfotransferases (SULTs) in Human Tissues: The SULT "Pie." *Drug Metabolism and Disposition*, *37*(11), 2255–2261. https://doi.org/10.1124/dmd.109.028399

Rodriguez, A., Strucko, T., Stahlhut, S. G., Kristensen, M., Svenssen, D. K., Forster, J., Nielsen, J., & Borodina, I. (2017). Metabolic engineering of yeast for fermentative production of flavonoids. *Bioresource Technology*, *245*, 1645–1654. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.043

Rothwell, J. A., Urpi-Sarda, M., Boto-Ordoñez, M., Llorach, R., Farran-Codina, A., Barupal, D. K., Neveu, V., Manach, C., Andres-Lacueva, C., & Scalbert, A. (2015). Systematic analysis of the polyphenol metabolome using the Phenol-Explorer database. *Molecular Nutrition & Food Research*, *60*(1), 203–211. https://doi.org/10.1002/mnfr.201500435

Roubalová, L., Purchartová, K., Papoušková, B., Vacek, J., Křen, V., Ulrichová, J., & Vrba, J. (2015). Sulfation modulates the cell uptake, antiradical activity and biological effects of flavonoids in vitro: An examination of quercetin, isoquercitrin and taxifolin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *23*(17), 5402–5409. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.07.055

Saito, K., Yonekura-Sakakibara, K., Nakabayashi, R., Higashi, Y., Yamazaki, M., Tohge, T., & Fernie, A. R. (2013). The flavonoid biosynthetic pathway in Arabidopsis: Structural and genetic diversity. *Plant Physiology and Biochemistry*, *72*, 21–34. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.02.001

Santos, E. L., Maia, B. H. L. N. S., Ferriani, A. P., & Teixeira, S. D. (2017). Flavonoids: Classification, Biosynthesis and Chemical Ecology. *Flavonoids - from Biosynthesis to Human Health*. https://doi.org/10.5772/67861

Santos, E. L.; Maia, B. H. L. N. S.; Ferriani, A. P.; Teixeira, S. D. (2017) . *In Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health*. 1st edition, IntechOpen: London,472 strán

Sarkar, C., Chaudhary, P., Jamaddar, S., Janmeda, P., Mondal, M., Mubarak, M. S., & Islam, M. T. (2022). Redox Activity of Flavonoids: Impact on Human Health, Therapeutics, and Chemical Safety. *Chemical Research in Toxicology*, *35*(2). https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.1c00348

Scalbert, A., & Williamson, G. (2000). Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *The Journal of Nutrition*, *130*(8), 2073S2085S. https://doi.org/10.1093/jn/130.8.2073s

Schär, M. Y., Curtis, P. J., Hazim, S., Ostertag, L. M., Kay, C. D., Potter, J. F., & Cassidy, A. (2015). Orange juice–derived flavanone and phenolic metabolites do not acutely affect cardiovascular risk biomarkers: a randomized, placebo-controlled, crossover trial in men at moderate risk of cardiovascular disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *101*(5), 931–938. https://doi.org/10.3945/ajcn.114.104364

Selvakumar, P., Badgeley, A., Murphy, P., Anwar, H., Sharma, U., Lawrence, K., & Lakshmikuttyamma, A. (2020). Flavonoids and Other Polyphenols Act as Epigenetic Modifiers in Breast Cancer. *Nutrients*, *12*(3), 761. https://doi.org/10.3390/nu12030761

Serafini, M., Peluso, I., & Raguzzini, A. (2010). Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proceedings of the Nutrition Society*, *69*(3), 273–278. https://doi.org/10.1017/s002966511000162x

Shackelford, R. E. (2005). Pharmacologic manipulation of the ataxia–telangiectasia mutated gene product as an intervention in age-related disease. *Medical Hypotheses*, *65*(2), 363–369. https://doi.org/10.1016/j.mehy.2005.02.015

Shah, A., Ahmad Bazli Ramzi, Syarul Nataqain Baharum, Normah Mohd Noor, Goh, H.-H., Thean Chor Leow, Siti Nurbaya Oslan, & Sabri, S. (2019). Recent advancement of engineering microbial hosts for the biotechnological production of flavonoids. *Molecular Biology Reports*, *46*(6), 6647–6659. https://doi.org/10.1007/s11033-019-05066-1

Shen, N., Wang, T., Gan, Q., Liu, S., Wang, L., & Jin, B. (2022). Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. *Food Chemistry*, *383*, 132531. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132531

Sheng, H., Sun, X., Yan, Y., Yuan, Q., Wang, J., & Shen, X. (2020). Metabolic Engineering of Microorganisms for the Production of Flavonoids. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *8*, 589069. https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.589069

Shrestha, A., Pandey, R. P., Dhakal, D., Parajuli, P., & Sohng, J. K. (2018). Biosynthesis of flavone C-glucosides in engineered Escherichia coli. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *102*(3), 1251–1267. https://doi.org/10.1007/s00253-017-8694-6

Simpson, L. S., & Widlanski, T. S. (2006). A Comprehensive Approach to the Synthesis of Sulfate Esters. *Journal of the American Chemical Society*, *128*(5), 1605–1610. https://doi.org/10.1021/ja056086j

Slámová, K., Kapešová, J., & Valentová, K. (2018). "Sweet Flavonoids": Glycosidase-Catalyzed Modifications. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(7), 2126. https://doi.org/10.3390/ijms19072126

SOIDINSALO, O., & WAHALA, K. (2007). Synthesis of daidzein 7-O-β-d-glucuronide-4′-O-sulfate. *Steroids*, *72*(13), 851–854. https://doi.org/10.1016/j.steroids.2007.07.001

Suleria, H. A. R., Barrow, C. J., & Dunshea, F. R. (2020). Screening and Characterization of Phenolic Compounds and Their Antioxidant Capacity in Different Fruit Peels. *Foods*, *9*(9), 1206. https://doi.org/10.3390/foods9091206

synthetic flavonoids on growth of pathogenic and probiotic bacteria. *J. Chem. Pharm. Res*, *7*(10), 228-236.

Tanaka, Y., & Ohmiya, A. (2008). Seeing is believing: engineering anthocyanin and carotenoid biosynthetic pathways. *Current Opinion in Biotechnology*, *19*(2), 190–197. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.02.015

Tang, L., Ye, L., Singh, R., Wu, B., Lv, C., Zhao, J., Liu, Z., & Hu, M. (2010). Use of Glucuronidation Fingerprinting To Describe and Predict Mono- and Dihydroxyflavone Metabolism by Recombinant UGT Isoforms and Human Intestinal and Liver Microsomes. *Molecular Pharmaceutics*, *7*(3), 664–679. https://doi.org/10.1021/mp900223c

Taniguchi, M., LaRocca, C. A., Bernat, J. D., & Lindsey, J. S. (2023). Digital Database of Absorption Spectra of Diverse Flavonoids Enables Structural Comparisons and Quantitative Evaluations. *Journal of Natural Products*, *86*(4). https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.2c00720

Taylor, S. D., & Desoky, A. (2011). Rapid and efficient chemoselective and multiple sulfations of phenols using sulfuryl imidazolium salts. *Tetrahedron Letters*, *52*(26), 3353–3357. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2011.04.080

Teles, Y., Horta, C., Agra, M., Siheri, W., Boyd, M., Igoli, J., Gray, A., & de Souza, M. (2015). New Sulphated Flavonoids from Wissadula periplocifolia (L.) C. Presl (Malvaceae). *Molecules*, *20*(11), 20161–20172. https://doi.org/10.3390/molecules201119685

Teles, Y., Souza, M., & Souza, M. (2018). Sulphated Flavonoids: Biosynthesis, Structures, and

Biological Activities. *Molecules*, *23*(2), 480. https://doi.org/10.3390/molecules23020480

Terao, J. (2017). Factors modulating bioavailability of quercetin-related flavonoids and the consequences of their vascular function. *Biochemical Pharmacology*, *139*, 15–23. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.03.021

Teubner, W., Meinl, W., Florian, S., Kretzschmar, M., & Glatt, H. (2007). Identification and localization of soluble sulfotransferases in the human gastrointestinal tract. *Biochemical Journal*, *404*(2), 207–215. https://doi.org/10.1042/bj20061431

Tian, Y., Bian, Y., Jiang, Y., Qian, S., Yu, A., & Zeng, S. (2015). Interplay of breast cancer resistance protein (BCRP) and metabolizing enzymes. *Current drug metabolism*, *16*(10), 877-893.

Todd, J. S., Zimmerman, R. C., Crews, P., & Alberte, R. S. (1993). The antifouling activity of natural and synthetic phenol acid sulphate esters. *Phytochemistry*, *34*(2), 401–404. https://doi.org/10.1016/0031-9422(93)80017-m

Tominaga, Y., Mae, T., Kitano, M., Sakamoto, Y., Ikematsu, H., & Nakagawa, K. (2006). Licorice Flavonoid Oil Effects Body Weight Loss by Reduction of Body Fat Mass in Overweight Subjects. *Journal of Health Science*, *52*(6), 672–683. https://doi.org/10.1248/jhs.52.672

Trischitta, F., & Faggio, C. (2006). Effect of the flavonol quercetin on ion transport in the isolated intestine of the eel, Anguilla anguilla. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Toxicology & Pharmacology/Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology*, *143*(1), 17–22. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.11.012

Tsao, R. (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*, *2*(12), 1231–1246. https://doi.org/10.3390/nu2121231

Tumova, S., Kerimi, A., & Williamson, G. (2019). Long term treatment with quercetin in contrast to the sulfate and glucuronide conjugates affects HIF1α stability and Nrf2 signaling in endothelial cells and leads to changes in glucose metabolism. *Free Radical Biology & Medicine*, *137*, 158–168. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.04.023

Tungmunnithum, D., Thongboonyou, A., Pholboon, A., & Yangsabai, A. (2018). Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview. *Medicines*, *5*(3), 93. https://doi.org/10.3390/medicines5030093

Ung, D., & Nagar, S. (2007). Variable Sulfation of Dietary Polyphenols by Recombinant Human Sulfotransferase (SULT) 1A1 Genetic Variants and SULT1E1. *Drug Metabolism and Disposition*, *35*(5), 740–746. https://doi.org/10.1124/dmd.106.013987

Valentová, K., Káňová, K., Di Meo, F., Pelantová, H., Chambers, C., Rydlová, L., Petrásková, L., Křenková, A., Cvačka, J., Trouillas, P., & Křen, V. (2017). Chemoenzymatic Preparation and Biophysical Properties of Sulfated Quercetin Metabolites. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(11), 2231. https://doi.org/10.3390/ijms18112231

Valentová, K., Purchartová, K., Rydlová, L., Roubalová, L., Biedermann, D., Petrásková, L., Křenková, A., Pelantová, H., Holečková-Moravcová, V., Tesařová, E., Cvačka, J., Vrba, J., Jitka Ulrichová, & Vladimír Křen. (2018). Sulfated Metabolites of Flavonolignans and 2,3-Dehydroflavonolignans: Preparation and Properties. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(8), 2349–2349. https://doi.org/10.3390/ijms19082349

Valeria, C., Ana, E. B., Ángel, G. R., & Paula, M. A. (2013). Sulfated flavonoid isolated from Flaveria bidentis and its semisynthetic derivatives as potential drugs for Alzheimers disease.

Veitch, N. C., Elliott, P. C., Kite, G. C., & Lewis, G. P. (2010). Flavonoid glycosides of the black locust tree, Robinia pseudoacacia (Leguminosae). *Phytochemistry*, *71*(4), 479–486. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.10.024

Walle, T. (2004). Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, *36*(7), 829–837. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.01.002

Wang, P., Li, C., Li, X., Huang, W., Wang, Y., Wang, J., Zhang, Y., Yang, X., Yan, X., Wang,

Y., & Zhou, Z. (2021). Complete biosynthesis of the potential medicine icaritin by engineered Saccharomyces cerevisiae and Escherichia coli. *Science Bulletin*, *66*(18), 1906–1916. https://doi.org/10.1016/j.scib.2021.03.002

Wang, X., Ouyang, Y. Y., Liu, J., & Zhao, G. (2013). Flavonoid intake and risk of CVD: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *British Journal of Nutrition*, *111*(1), 1–11. https://doi.org/10.1017/s000711451300278x

Wang, Y., Chen, S., & Yu, O. (2011). Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *91*(4), 949–956. https://doi.org/10.1007/s00253-011-3449-2

Williams, C. A., & Grayer, R. J. (2004). Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Product Reports*, *21*(4), 539. https://doi.org/10.1039/b311404j

Williamson, G., Kay, C. D., & Crozier, A. (2018). The Bioavailability, Transport, and Bioactivity of Dietary Flavonoids: A Review from a Historical Perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *17*(5), 1054–1112. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12351

Wong, C. C., Botting, N. P., Orfila, C., Al-Maharik, N., & Williamson, G. (2011). Flavonoid conjugates interact with organic anion transporters (OATs) and attenuate cytotoxicity of adefovir mediated by organic anion transporter 1 (OAT1/SLC22A6). *Biochemical Pharmacology*, *81*(7), 942–949. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.01.004

Woo, H. D., & Kim, J. (2013). Dietary Flavonoid Intake and Smoking-Related Cancer Risk: A Meta-Analysis. *PLoS ONE*, *8*(9), e75604. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075604

Xia, H., Qiu, F., Zhu, S., Zhang, T., Qu, G., & Yao, X. (2007). Isolation and Identification of Ten Metabolites of Breviscapine in Rat Urine. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, *30*(7), 1308–1316. https://doi.org/10.1248/bpb.30.1308

Xu, P., Marsafari, M., Zha, J., & Koffas, M. (2020). Microbial Coculture for Flavonoid Synthesis. *Trends in Biotechnology*, *38*(7), 686–688. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.01.008

Yagi, A., Uemura, T., Okamura, N., Haraguchi, H., Imoto, T., & Hashimoto, K. (1994). Antioxidative sulphated flavonoids in leaves of Polygonum hydropiper. *Phytochemistry*, *35*(4), 885–887. https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)90632-0

Yan, Y., Stoddard, F. L., Neugart, S., Sadras, V. O., Lindfors, A. V., Luis Orlando Morales, & Aphalo, P. J. (2019). Responses of flavonoid profile and associated gene expression to solar blue and UV radiation in two accessions of Vicia faba L. from contrasting UV environments. *Photochemical and Photobiological Sciences*, *18*(2), 434–447. https://doi.org/10.1039/c8pp00567b

Yao, L. H., Jiang, Y. M., Shi, J., Tomas-Barberan, F. A., Datta, N., Singanusong, R., & Chen, S. S. (2004). Flavonoids in Food and Their Health Benefits. *Plant Foods for Human Nutrition*, *59*(3), 113–122. https://doi.org/10.1007/s11130-004-0049-7

Zhang, Q., Raheem, K. S., Botting, N. P., Slawin, A. M. Z., Kay, C. D., & O'Hagan, D. (2012). Flavonoid metabolism: the synthesis of phenolic glucuronides and sulfates as candidate metabolites for bioactivity studies of dietary flavonoids. *Tetrahedron*, *68*(22), 4194–4201. https://doi.org/10.1016/j.tet.2012.03.100

Zhang, S., Yang, J., Li, H., Chiang, V. L., & Fu, Y. (2021). Cooperative Regulation of Flavonoid and Lignin Biosynthesis in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *40*(2), 109–126. https://doi.org/10.1080/07352689.2021.1898083

Ziberna, L., Kim, J.-H., Auger, C., Passamonti, S., & Valérie Schini-Kerth. (2013). Role of endothelial cell membrane transport in red wine polyphenols-induced coronary vasorelaxation: involvement of bilitranslocase. *Food & Function*, *4*(10), 1452–1452. https://doi.org/10.1039/c3fo60160a

Ziberna, L., Tramer, F., Moze, S., Vrhovsek, U., Mattivi, F., & Passamonti, S. (2012). Transport and bioactivity of cyanidin 3-glucoside into the vascular endothelium. *Free Radical Biology and Medicine*, *52*(9), 1750–1759. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.02.027

8 ZOZNAM SKRATIEK

AM	ampelopsín
AM-S	ampelopsín-3'-*O*-sulfát
AP	apigenín
AP-S	apigenín-4'-*O*-sulfát
ARE	prvok antioxidačnej reakcie
AST	arylsulfotransferáza
BCRP/ABCG2	protein rezistencie rakoviny prsníka
bZIP	bazické zipy leucínu
ATP	adenosintrifosfát
cDNA	komplementárna DNA
CNC	Cap' n' Collar
CoA	koenzým A
CYP	cytochróm P450
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimetylsulfoxid
dNTP	deoxyribonukleotidtrifosfát
DPPH	1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl
FBS	fetálne bovinné sérum
FI	fisetín
FI-S	fisetín-3'-*O*-sulfát
GAPDH	gén pre glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenázu
HE	hesperetín
HE-S	hesperetín-3'-*O*-sulfát
Hmox1	gén pre hemoxygenázu 1
HMOX1	hemoxygenáza 1
KEAP1	proteín asociovaný s Kelch-like-ECH
MTT	3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5 difenyltetrazoliumbromid
MY	myricetín
MY-S	myricetín-3'-*O*-sulfát
NA	naringenín

NA-S	naringeín-4'-*O*-sulfát
NADPH	nikontínamidadenindinukleotidfosfát
Neh	konzervované homológne domény NRF2-ECH
Nfe2l2	gén pre jadrový faktor podobný erytroidnému faktoru 2
NMR	nukleárna magnetická rezonancia
Nqo1	gén pre NAD(P)H: chinón oxidoreduktázu 1
NQO1	NAD(P)H: chinón oxidoreduktáza 1
NRF2, NFE2L2	nuclear factor erythroid 2- related factor
OATP	polypeptid transportujúci anorganický anión
PAPS	3'-fosfoadenozín-5'-fosfosulfát
QUE	kvercetin
SFN	sulforafan
SOT	cytosolické sulfotransferázy
UV	ultrafialový