

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2014

Petra Juřicová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Elektrochemie flavonolignanů a jejich interakce s DNA

Diplomová práce

Petra Juřicová

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Forma studia: Prezenční

Olomouc 2014

Vedoucí práce: Doc. Ing. Jan Vacek, Ph.D.
Pracoviště: LF UP, Ústav lékařské chemie a biochemie

Prohlašuji, že jsem se na vypracování diplomové práce podílela sama, za pomoci Doc. Ing. Jana Vacka, Ph.D. a za použití uvedené literatury v seznamu.

V Olomouci dne

.....
Petra Juřicová

SOUHRN

Elektrochemické metody jsou využívány pro výzkum nízkomolekulárních biologicky aktivních látek zejména ke studiu redoxních procesů, reaktivity, chemických modifikací, stability a kinetických dějů. Uplatnění nachází také při studiu biomakromolekul, jejich strukturních změn a intra- a inter-molekulárních interakcí. V předkládané diplomové práci byly aplikovány elektrochemické metody pro analýzu antioxidačního potenciálu a interakcí flavonolignanů a jejich 2,3-dehydroderivátů s DNA. K těmto účelům byla využita cyklická voltametrie (CV) a voltametrie s vkládaným pravoúhlým napětím (SWV). Elektrochemické výsledky byly také podpořeny elektroforetickými analýzami. Bylo popsáno základní elektrochemické chování silybinu (SB), dehydrosilybinu (DHSB), silychristinu (SCH), dehydrosilychristinu (DHSCH), silydianinu (SD) a dehydrosilydianinu (DHSD) a byla srovnána jejich schopnost odevzdávat elektrony (resp. podléhat oxidaci) ve vodném prostředí při pH 7,4. Bylo prokázáno, že 2,3-dehydroderiváty (DHSCH, DHSB, DHSD) se oxidují při nižších potenciálech (~250 mV) než-li samotný SB, SD a SCH. Z uvedeného můžeme usuzovat, že 2,3-dehydroderiváty jsou efektivnějšími antioxidanty jak parentní látky. Dále byla experimentální práce zaměřena na interakce flavonolignanů s DNA a analýzu prooxidačních účinků reaktivních komplexů výše uvedených flavonolignanů s Fe^{3+} ionty. Získané výsledky mohou být dále využity v biochemických studiích zaměřených na výzkum reaktivity a stability flavonolignanů.

SUMMARY

Electrochemical methods can be used for the analysis of low-molecular biologically active substances and investigation of their redox behavior, reactivity, covalent modifications, stability and kinetic processes. In addition to this, electrochemistry is important tool for study of biomacromolecules (i.g. DNA and proteins) and their structural changes and intra- or inter-molecular interactions. In the presented diploma thesis, electrochemical methods were used for the analysis antioxidant capacity and interactions of flavonolignans with DNA. For this purposes cyclic voltammetry (CV) and square-wave voltammetry (SWV) were applied. Electrochemical results were also supported by electrophoretic analysis. Concretely, electrochemical behavior and electron-donor ability for silybin (SB), dehydrosilybin (DHSB), silychristin (SCH), dehydrosilychristin (DHSCH), silydianin (SD) and dehydrosilydian (DHSD) were described at pH 7.4. The 2,3-dehydroderivatives undergo oxidation (around 250 mV) easily in comparison to SB, SD and SCH. From above-mentioned one can deduced that 2,3-dehydroderivatives are most effective antioxidants than parent flavonolignans. In next experimental work interaction of reactive Fe-flavonolignan complexes with DNA was examined. The results presented here could be used in future biochemical studies focused on investigation of reactivity and stability of flavonolignans.

Ráda bych poděkovala vedoucímu diplomové práce Doc. Ing. Janu Vackovi, Ph.D. za jeho vstřícnost a odborné vedení mé diplomové práce. Dále bych také chtěla poděkovat Mgr. Martině Zatloukalové, Mgr. Michaele Pyszkové a Alžbětě Balharové za trpělivost a odbornou pomoc v průběhu vykonávání praktické části. Rovněž bych tímto chtěla poděkovat i celému Ústavu lékařské chemie a biochemie UP za velmi přátelské prostředí. Autorka děkuje prof. RNDr. Vladimíru Křenovi, DrSc. a jeho týmu, který provedl izolaci a purifikaci flavonolignanů.

OBSAH

1 Úvod.....	1
2 Současný stav řešené problematiky.....	2
2.1 Biologická aktivita flavonoidů a jejich antioxidační vlastnosti.....	2
2.1.1 Struktura flavonoidů.....	2
2.1.1.1 Výskyt a struktura flavonolignanů	2
2.1.2 Antioxidační vlastnosti flavonoidů.....	4
2.1.2.1 Vznik ROS v organismu.....	4
2.1.2.1.1 Oxidační poškození biomolekul a oxidační stres....	5
2.1.2.1.2 Oxidační poškození DNA zprostředkované kovy a komplexy flavonolignan/kov.....	5
2.1.3 Využití flavonolignanů a silymarinu v prevenci a podpůrné léčbě civilizačních onemocnění.....	6
2.1.3.1 Silybin jako potencionální agens v léčbě rakoviny.....	6
2.1.3.2 Látky silybin a silymarin v léčbě a prevenci gastrointestinálních chorob.....	7
2.1.3.3 Flavonolignany a neurodegenerativní onemocnění.....	7
2.1.3.4 Využití 2,3–dehydrosilybinu v terapii kožních nemocí.....	7
2.2 Aplikace elektroforetických a elektrochemických metod.....	7
2.2.1 Elektrochemické metody.....	7
2.2.1.1 Voltampérometrie (voltametrie).....	8
2.2.1.1.1 Voltametrie s lineárním skenem (LSV) a cyklická voltametrie (CV).....	9
2.2.1.1.2 Diferenční pulzní voltametrie (DPV).....	10
2.2.2 Elektrolyty	10
2.2.3 Elektrody používané ve voltampérometrii.....	10
2.2.3.1 Rtuťové elektrody.....	10
2.2.3.2 Tuhé elektrody.....	11
2.2.3.2.1 Kovové elektrody.....	11
2.2.3.2.2 Uhlíkové elektrody.....	12
2.2.3.3 Srovnání tuhých a rtuťových elektrod.....	13
2.2.4 Studium mechanismu oxidace a antioxidační kapacity v praxi.....	14
2.2.5 Elektrochemická analýza nukleových kyselin.....	15
3 Cíl práce.....	18

4 Materiál a metodika.....	19
4.1 Chemikálie.....	19
4.1.1 Složky nutné pro konstrukci pyrolytické grafitové elektrody (PGE)	21
4.1.2 Složení tlumivých vodných roztoků	21
4.1.3 Látky použité na tvorbu komplexu flavonolignan/kov.....	22
4.1.4 Příprava látek pro elektroforézu a studium jejich prooxidačních vlastností	22
4.1.5 Příprava tlumivého roztoku 10x TBE pro elektroforézu.....	23
4.1.6 Příprava polyakrylamidového gelu.....	24
4.1.7 Barvení PAA gelu 0,02% metylenovou modří.....	24
4.2 Použité metody.....	24
4.2.1 Konstrukce pyrolytické uhlíkové elektrody.....	24
4.2.2 Příprava pufrů.....	26
4.2.3 Příprava vzorků pro elektrochemickou analýzu.....	27
4.2.4 Aplikace vzorku na povrch pracovní elektrody.....	27
4.2.4.1 <i>Ex situ</i>	27
4.2.4.2 <i>In situ</i>	27
4.2.5 Elektrochemické měření flavonolignanů.....	27
4.2.6 Zpracování dat.....	28
4.2.7 Tvorba komplexů flavonolignan/kov.....	28
4.2.8 Příprava vzorků pro studium interakce flavonolignanů s DNA a jejich prooxidačních efektů.....	29
4.2.9 Gelová elektroforéza.....	30
5 Výsledky.....	31
6 Diskuse.....	38
7 Závěr.....	40
8 Literatura.....	41
9 Seznam použitých zkratk.....	45
10 Přílohy.....	46

1. ÚVOD

Elektrochemické metody nacházejí velmi široké uplatnění při studiu reaktivity, redoxních dějů, strukturních změn a modifikací a stability nízkomolekulárních biologicky aktivních látek. V biochemii a molekulární biologii mohou být elektrochemické metody využity pro studium interakcí biomakromolekul a jejich intermolekulárních interakcí. Tato diplomová práce je zaměřena na analýzu reaktivity a mezimolekulárních interakcí flavonolignanů. Byl studován mechanismus oxidace, antioxidační kapacita a prooxidační účinky. Dále byla zkoumána jejich reaktivita ve vodném prostředí a interakce s DNA. Pro výzkum interakce s DNA byly připraveny reaktivní komplexy flavonolignan/kov.

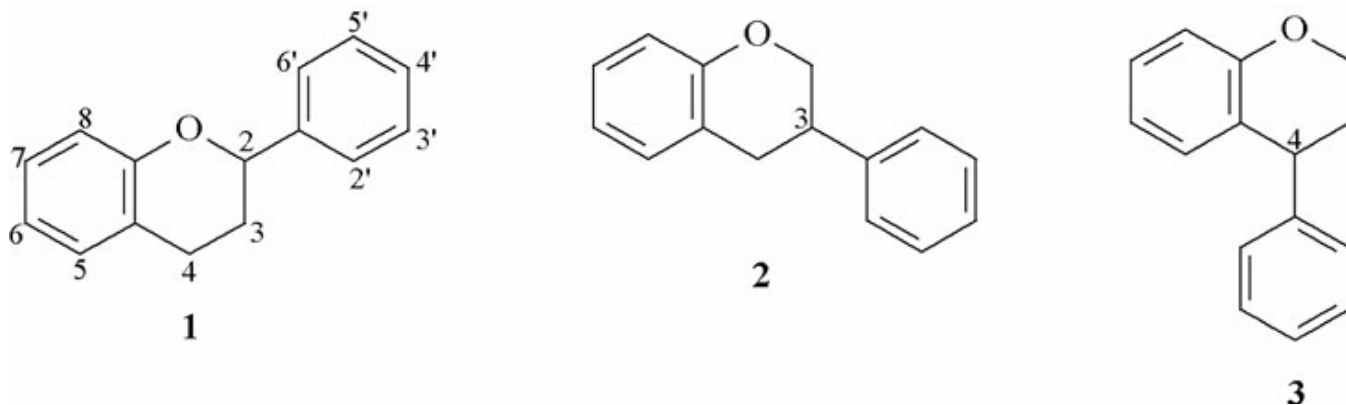
2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Biologická aktivita flavonoidů a jejich antioxidační vlastnosti

2.1.1 Struktura flavonoidů

Flavonoidy jsou přírodní látky nebo i synteticky připravené substance, které obsahují skelet uhlíku C6-C3-C6 a fenylobenzopyran. Základní strukturu flavonoidů tvoří dva aromatické kruhy (A, B) propojené s jedním heterocyklem pyranu (C). V závislosti na propojení aromatického kruhu s benzopyranovou skupinou lze tyto polyfenolové látky rozdělit do tří skupin: flavonoidy (2-fenylobenzopyran), isoflavonoidy (3-benzopyran), neoflavonoidy (4-benzopyran) (Grotewold, 2006) (Obr. 1).

Obr. 1 – Rozdělení polyfenolových látek dle skeletu: flavonoidy (1), isoflavonoidy (2) a neoflavonoidy (3) (Grotewold, 2006).



Tyto molekuly mohou být různě modifikovány např. methylací, hydroxylací, acylací aj., díky nimž je vytvořena velká rozmanitost těchto látek v rámci celé třídy flavonoidů (Pourcel a kol., 2006). Sekundárně lze dle struktury flavonoidy rozlišit na flavony, flavonololy, flavanony, flavanonoly, isoflavony a flavanoly (Heim a kol., 2002). Významnou skupinu látek patřící do skupiny flavonololů tvoří flavonolignany (Trouillas a kol., 2008).

2.1.1.1 Výskyt a struktura flavonolignanů

Flavonolignany patří mezi látky vyskytující se v cévnatých rostlinách, kde se zapojují do

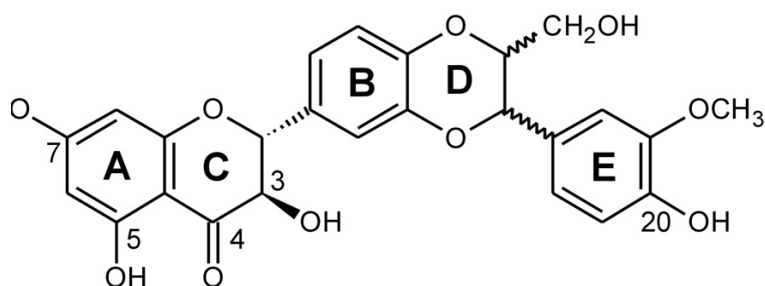
procesu ochrany proti UV záření, herbivorům a procesu růstu a vývoje (Grotewold, 2006). Flavonolignany se vyskytují v komplexu silymarinu v rostlině bodláku ostropestřce mariánského *Silybum marianum* (L.) Gaertn. z čeledi hvězdnicovitých (Obr. 2) (Křen, Walterová, 2005).

Obr. 2 – Ostropestřec mariánský. Zdroj: <http://vlastovka.info>



Silymarin je standardizovaný extrakt získaný ze semen *Silybum marianum* (L.) Gaertn. Hlavní komponentou silymarinu je silybin existující ve dvou diastereoizomerech A a B. Další účinné látky jsou dehydrosilybin, isosilybin, silydianin, silychristin a taxifolin (Křen, Walterová, 2005). Účinné látky jsou využívány k podpurné léčbě jaterních onemocnění, otrav mykotoxiny a jako účinné antioxidanty a cytoprotektiva. Chemická struktura flavonolignanů vychází ze základní struktury flavonoidů (Obr. 3), kterou tvoří skelet uhlíku C6-C3-C6 a je rozdělena do pěti kruhů (A, B, C, D, E) (Zatloukalová a kol., 2011).

Obr. 3 – Základní struktura flavonolignanů silybinu.



2.1.2 Antioxidační vlastnosti flavonoidů

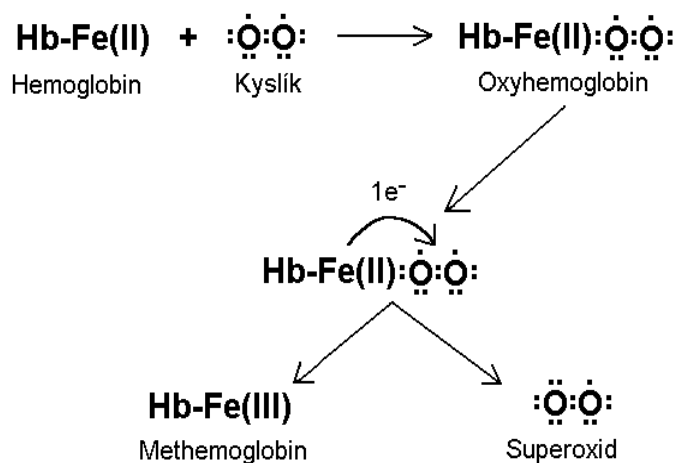
Termín antioxidační efekt označuje snižování množství volných kyslíkových radikálů. Volné radikály způsobují poškození DNA a inaktivaci enzymů. Antioxidační vlastnosti fenolových látek jsou spojeny s chelatací kovových iontů a inhibicí aktivity oxidáz. Často je antioxidační aktivita doprovázena jejich antivirovými a antibakteriálními účinky (Materska, 2008). Antioxidační vlastnosti vykazují řada látek, které lze rozdělit do dvou skupin. Mezi antioxidanty neflavonoidního charakteru patří vitamíny, minerály a rostlinné pigmenty (vitamin B a C, selen, beta-karoten) obsažené v ovoci a zelenině. (Quideau a kol., 2011). Druhou skupinu tvoří nízkomolekulární antioxidanty flavonoidní povahy, mezi které patří flavonolignany, antokyanidiny, isoflavonoidy a flavonoly. Se strukturou flavonoidů je spojena jejich antioxidační kapacita (Edenharder a kol., 2003). Antioxidační aktivita a reaktivita sloučeniny je určena přítomností hydroxylových skupin a jejich vzájemným umístěním (Materska, 2008). Na antioxidačních vlastnostech flavonolignanů se nejvýznaměji podílí hydroxylové skupiny 3-OH, 20-OH a 5-OH (Vacek a kol., 2013).

Antioxidační vlastnosti flavonoidů chrání DNA před poškozením (Ahmad a kol., 2010), jenž je způsobeno reaktivními formami kyslíku (ROS – *reactive oxygen species*), mezi které patří např. hydroxylový radikál, peroxid vodíku nebo superoxid ($\cdot\text{OH}$, H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$) (Tan a kol., 2009).

2.1.2.1 Vznik ROS v organismu

Reaktivní forma kyslíku – superoxid - vzniká v organismu z oxyhemoglobinu. Reakce hemoglobinu s kyslíkem dává vznik oxyhemoglobinu, který disociuje na methemoglobin a superoxid (Grinberg a kol., 1994) (Obr.4)

Obr. 4 – Vznik superoxidu v organismu.



Další možností je vznik superoxidu v dýchacím řetězci mitochondrií. Dismutací superoxidu vzniká peroxid vodíku (Matsuura a kol., 2014):



Peroxid vodíku sám o sobě není moc reaktivní, ale velmi rychle reaguje s redukovanými přechodnými kovy jako jsou např. měď nebo železo. Jedná se o tzv. Fentonovu reakci, při níž vzniká hydroxylový radikál (Perron a kol., 2011):



Hydroxylový radikál je extrémně reaktivní a pro organismus toxický. Poškozuje biomakromolekuly (lipidy, proteiny, nukleové kyseliny) poblíž místa svého vzniku (Edenharder a kol., 2003). Na eliminaci hydroxylového radikálu se v organismu podílí enzymy glutathionperoxidasa a katalasa (Matsuura a kol., 2014).

ROS mají kromě svých negativních účinků také účinky pozitivní, a proto musí být jejich hladina udržována v určitých mezích zajišťující redoxní rovnováhu. Oxidační stres aktivuje určité protein kinázy a transkripční faktory, uplatňující se při stimulaci proliferace a senescenci (stárnutí) buněk. Samotné ROS jsou mediátory zánětlivé reakce, podílejí se na fagocytóze mikrobů nebo nádorových buněk a na hydroxylaci steroidů a xenobiotik. (Edenharder a kol., 2003; Matsuura a kol., 2014).

2.1.2.1.1 Oxidační poškození biomolekul a oxidační stres

Oxidační poškození u lipidů má za následek peroxidaci polynenasycených mastných kyselin v membránách (Zhu a kol., 2013). U proteinů dochází k oxidaci – SH skupin a hydroxylaci aromatických aminokyselin. V nukleových kyselinách pak vznikají zlomy DNA řetězce, dochází k fragmentaci a celkově může docházet k mutacím a kancerogenezi (Gutteridge, 1993).

2.1.2.1.2 Oxidační poškození DNA zprostředkované kovy a komplexy flavonolignan/kov

Oxidativní poškození DNA je spojeno především s tvorbou hydroxylového radikálu, který vzniká ve Fentonově reakci oxidací Cu^{I} nebo Fe^{II} peroxidem vodíku. Prooxidační aktivita flavonolignanů je spojena s redukcí $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$, díky níž vzniká $\text{Cu}^{\text{I}}/\text{Fe}^{\text{II}}$. Takto redukované kovy

mohou reagovat s H_2O_2 a tvořit vysoce reaktivní $\cdot OH$, jehož působení v prokaryotických i eukaryotických buňkách způsobuje jejich apoptózou a oxidativní stres. Cu^I generuje poškození DNA 60x rychleji než Fe^{II} (Perron a kol., 2011). Mechanismus tvorby komplexů spočívá v chelatační aktivitě flavonolignanů vázat kovy. Konkrétně se tvoří vazba mezi hydroxylovými skupinami nebo oxo skupinami. Ke tvorbě komplexu dochází v organismu po požití flavonolignanu. Tyto komplexy mohou interagovat s DNA a indukovat tvorbu ROS, které pak způsobují oxidativní degradaci a fragmentaci DNA (Vacek a kol., 2013).

2.1.3 Využití flavonolignanů a silymarinu v prevenci a podpůrné léčbě civilizačních onemocnění

Flavonolignany jsou látky široce studovány zejména kvůli jejich antioxidačním a hepatoprotektivním vlastnostem (Perron a kol., 2008). U zvířat bylo *in vivo* zjištěno, že chrání neurony před poškozením a snižují apoptózu. Studium obou efektů (antioxidačních i prooxidačních) flavonolignanů i ostatních polyfenolů je možno si vytvořit ucelený obraz o jejich biologické aktivitě (Perron a kol., 2011). Flavonolignany vykazují podpůrný léčebný efekt například u Alzheimerovy a Parkinsonovy choroby (Křen a Walterová, 2005) a rakoviny (Agarwal a kol., 2013)

2.1.3.1 Silybin jako potenciální agens v léčbě rakoviny

Současné metody léčby rakoviny, zejména chemoterapie, zahrnují mnohdy negativní vedlejší účinky, mezi něž patří akutní hepatotoxicita. Podpůrný potenciál v její léčbě vykazuje netoxická přírodní látka s minimálními vedlejšími účinky, silybin (Agarwal a kol., 2006).

Silybin byl již v historii hojně využíván, zejména pro své hepatoprotektivní účinky. Silybin snižuje toxicitu a zvyšuje účinnost chemoterapeutických léků v léčbě rakoviny (Agarwal a kol., 2013). Silybin vykazuje synergické účinky s léky cisplatina, doxorubicin a mitoxantron (Agarwal a kol., 2013). Efekt cisplatiny s fosfolipidovým komplexem silybinu byl testován na buňkách rakoviny vaječníku (A2780) a *in vivo* na myších (Křen, Walterová, 2005). Hlavním omezením silybinu (i všech složek komplexu silymarinu), bránící jeho širokému využití, je jeho nízká biologická dostupnost spojená s nízkou rozpustností ve vodě a jeho nízkou permeabilitou skrze střevní epitelální buňky (Gažák a kol., 2004; Zhu a kol., 2013). Biologická dostupnost byla zvýšena různými modifikacemi silybinu (fosfatidylcholin, nanosuspenze aj.) a vývojem nových forem aplikace (Agarwal a kol., 2013).

2.1.3.2 Látky silybin a silymarin v léčbě a prevenci gastrointestinálních chorob

Silybin působí ve slinivce břišní především jako chemoprotektant. Pozitivně působí na její obnovu po intoxikaci. U silybinu byly rovněž popsány pozitivní antiproliferativní a apoptické efekty, jenž má na rakovinné buňky tlustého střeva (HT-29) (Agarwal a kol., 2003).

Protektivní účinky silymarinu na slinivku břišní byly experimentálně zkoumány u krys, u nichž bylo vlivem látky alloxan vyvoláno onemocnění *diabetes mellitus I*. Alloxan indukuje tvorbu reaktivních kyslíkových derivátů, které dále způsobují nekrózu pankreatických β buněk, jenž jsou zodpovědné za tvorbu inzulinu (Křen, Walterová, 2005). Silymarin rovněž inhibuje produkci zánětlivých cytokinů (interleukin 1 β , interferon γ , interferon α), jenž také iniciují degradaci pankreatických β buněk a tím vznik cukrovky typu I (Matsuda a kol., 2005).

2.1.3.3 Flavonolignany a neurodegenerativní onemocnění

V nedávných studiích bylo zjištěno, že silymarin inhibuje produkci zánětlivých mediátorů, jako je např. *tumor necrosis factor - α* (TNF- α) a oxid dusnatý, čímž snižuje riziko poškození dopaminergních neuronů (Křen, Walterová, 2005). Silymarin efektivně chrání dopaminergní neurony před účinky lipopolysacharidu, jenž je zodpovědný za neurotoxicitu. Neurotoxicita je vyvolána inhibicí aktivace mozkových buněk tzv. mikroglíí (Wang a kol., 2002).

2.1.3.4 Využití 2,3-dehydrosilybinu v terapii kožních nemocí

V poslední době bylo zjištěno, že lze flavonolignany z komplexu silymarinu využít také při léčbě některých kožních onemocněních, jako je lupénka a další dermatitidy.

Nejúčinnější látkou v terapii kožních onemocnění se zdá být zatím 2,3-dehydrosilybin. Experimentálně bylo rovněž prokázáno, že silymarin inhibuje expresi cyklooxygenázy-2 (COX-2) a metabolitů prostaglandinu, které jsou zodpovědné za tvorbu kožních tumorů (Křen a Walterová, 2005).

2.2 Aplikace elektroforetických a elektrochemických metod

2.2.1 Elektrochemické metody

Elektroanalytické metody jsou založeny na generování analytických signálů elektrického charakteru (Vacek, Cibiček a kol., 2014). Mezi výhody, které tyto metody poskytují, patří

jednoduchá příprava vzorku a jeho rychlá analýza. Elektrochemické metody plně vyhovují všem požadavkům na metody používané ve stopové analýze. Ve srovnání s atomovou absorbní spektrometrií je výhodou těchto metod fakt, že poskytují informace nejen o celkové analytické koncentraci, ale i o oxidačním a redoxním stavu stanovovaných látek. Důležitost tohoto poznatku, si lze plně uvědomit na případu chromu – kdy Cr^{3+} je relativně málo toxický, ale Cr^{6+} je vysoce nebezpečný karcinogen (Markušová, 2000).

Mezi nejčastěji používané elektrochemické metody založené na elektrodovém ději patří polarografie, voltampérometrie, potenciometrie a coulometrie. Metody založené na elektrických vlastnostech zkoumaných roztoků označujeme jako konduktometrické či dieletrické. Další skupinu elektrochemických metod tvoří elektroforetické metody, založené na migraci nabitých částic v elektrickém poli. Při biochemických analýzách se elektrochemie uplatňuje na úrovni analýz vodných roztoků. Je využívána k analýze pH, iontů, glukózy, nádorových markerů a dalších látek (Vacek, Cibiček a kol., 2014). Elektrochemické metody se osvědčily při studiu struktury a strukturních změn, interakcí, poškození a chemických modifikací nukleových kyselin a proteinů (Vacek a kol., 2006).

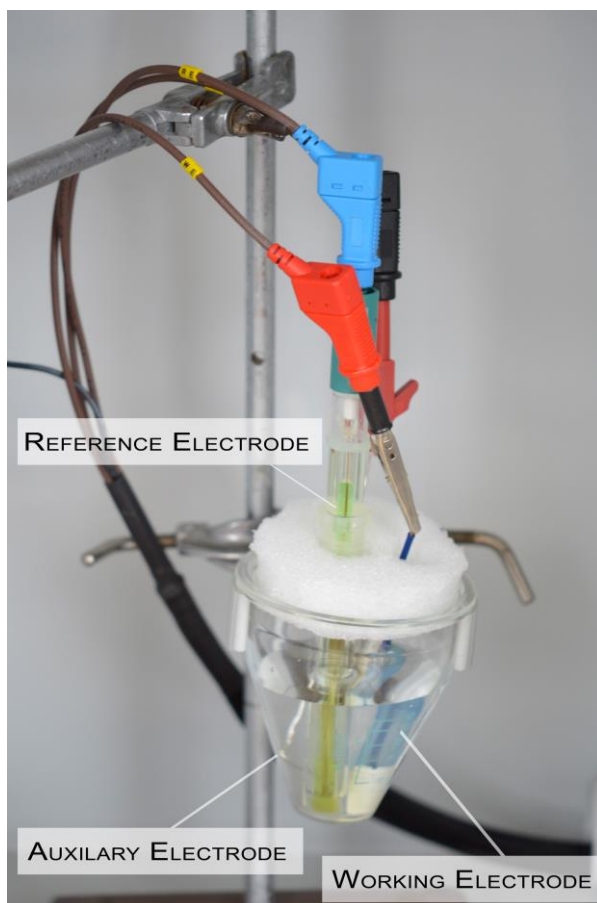
2.2.1.1 Voltampérometrie (voltametrie)

Voltampérometrie se řadí mezi techniky s kontrolovaným potenciálem, kdy na pracovní elektrodu vkládáme měnící se napětí a sledujeme proudovou složku (Vacek, Cibiček a kol., 2014). Termínu voltametrie se používá při práci se stacionární pracovní elektrodou (pevné elektrody, rtuťová filmová elektroda). Pro práci s klasickou kapající rtuťovou elektrodou se používá označení polarografie. Pro úplnost je nutné dodat, že voltametrické metody citlivě reagují nejen na elektroaktivní látky, ale i na elektronegativní aktivní komponenty a povrchově aktivní látky (Markušová, 2000). Moderní voltametrické techniky lze použít v řadě oborů jako je například toxikologie a farmakologie (analýza léčiv a hormonů). Dále nachází uplatnění v environmentální analýze (analýze pesticidů) a analýze potravin (Barek, 2006).

Přístrojové vybavení pro voltampérometrické metody je snadno dostupné. Nutný pro analýzu je elektrochemický analyzátor, který je tvořen z potenciostatu a generátoru potenciálové rampy. Většina dnešních analyzátorů má analyzátor řízený počítačem, který vyhodnocuje a archivuje měřené výsledky. Voltampérometrie využívá tříelektrodového zapojení (Markušová, 2000). Na obrázku 5 lze vidět uspořádání jednotlivých elektrod v elektrochemické cele. Označení elektrod vychází z anglického názvu (pracovní - *working*, referenční - *reference*, pomocná elektroda - *auxiliary*). Pracovní elektrody, na kterých sledujeme probíhající elektrodový proces, jsou kovové (Au, Pt, Hg) nebo uhlíkové. Potenciál pracovní elektrody je kontrolovaný vůči

referenční elektrodě s konstantním potenciálem. Jako referenční elektroda se v dnešní době používá argentchloridová elektroda, plněná 3 mol/l KCl, kterou označujeme jako Ag/AgCl (3 mol/l KCl) nebo saturovaná kalomelová elektroda (SCE). Pomocná elektroda je tvořena z inertního vodivého materiálu, nejčastěji z platinového drátku (Markušová, 2000; Zatloukalová a kol., 2011).

Obr. 5 – Tříelektrodové zapojení v elektrochemické cele (foto autorka).



2.2.1.1.1 Voltametrie s lineárním skenem (LSV) a cyklická voltametrie (CV)

Pomocí voltametrie s lineárním skenem je na pracovní elektrodě sledován proud ovlivněný potenciálem lineárně závislým na čase. Při cyklické voltametrii se ve srovnání s voltametrií s lineárním skenem změna napětí v určeném potenciálu nezastaví, ale obrátí se a začne se měnit v opačném směru. Cyklus lze měřit několikrát za sebou (Vychodilová, 2011).

2.3.1.1.2 Diferenční pulzní voltametrie (DPV)

S využitím pulzních metod se hodnota proudu odečítá v přesně definovaném čase po vložení napěťového pulzu. Pulzy mají podobu půlrozdělníků na napěťové rampě, která se mění lineárně v čase. K odečtení hodnoty proudu dochází těsně před vložení a před ukončením pulzu. Napěťový pulz trvá několik desítek milisekund. Kromě diferenční pulzní voltametrie je do skupiny pulzních metod řazena také metoda voltametrie s vkládaným pravoúhlým napětím (Vychodilová, 2011).

- **Voltametrie s vkládaným pravoúhlým napětím (SWV)**

Lineárně měnící se potenciál modulovaný napěťovými pulzy, které jsou pozitivní a negativní vůči potenciálové rampě, je vnášen na elektrodu. Proud je měřen vždy těsně před změnou potenciálu. Hodnoty proudu na pozitivním pulzu a negativním pulzu se od sebe odečítají (Vychodilová, 2011).

2.2.2 Elektrolyty

Hlavními úlohami elektrolytů v experimentech s kontrolovaným potenciálem je snížení odporu roztoku, udržování konstantní iontové síly a zajištění podobných fyziologických podmínek jako v organismu. Jako základní elektrolyty se nejčastěji používají anorganické soli a minerální kyseliny či zásady. V případě, že je potřeba po dobu měření udržovat konstantní pH se používají tlumivé vodné roztoky např. acetátový, fosfátový aj. (Markušová, 2000).

2.2.3 Elektrody používané ve voltampérometrii

2.2.3.1 Rtuťové elektrody

Rtuťové elektrody mají široký použitelný potenciálový interval v katodickém směru v porovnání s platinovými, uhlíkovými a jinými tuhými elektrodami. Široké potenciálové okno v katodickém směru je (od 0 až do -2,6 V vs. SCE) dáno díky intenzivnímu vylučování vodíku na povrchu elektrody (Markušová, 2000). Nejčastěji používané typy rtuťových elektrod jsou:

- kapající rtuťová elektroda (DME – *Dropping mercury electrode*)

DME se nejčastěji používá v polarografii a při elektrokapilárních měřeních (Markušová, 2000).

Ze všech rtuťových elektrod lze tuto elektrodu, zavedenou pro polarografické metody J. Heyrovským, považovat z hlediska obnovování povrchu za ideální (Yosypchuk, 2006).

- visící kapková rtuťová elektroda (HMDE – *hinging mercury dropping electrode*)

Základním principem, na kterém tato elektroda funguje, je skokové přerušení toku rtuti kapilárou. Vlastní elektrodou je kapka rtuti, tvořící se na konci kapiláry. Celé zařízení je automatizované. Vyznačuje se jednoduchou obsluhou a dobrou reprodukovatelností (Markušová, 2000).

- rtuťová filmová elektroda (MFE – *mercury film electrode*)

Tento typ rtuťové elektrody má široké využití tam, kde se při elektrochemické rozpustné analýze vyžaduje zvýšená citlivost stanovení. Díky tenké vrstvě rtuti se zamezí komplikacím s fúzí reaktantu na povrchu elektrody. Při elektrochemické rozpouštěcí analýze může být dosaženo lepší selektivity píků (oproti HMDE) (Markušová, 2000).

2.2.3.2 Tuhé elektrody

Zatímco povrch rtuťových elektrod je homogenní a dokonale se obnovuje odkapáváním rtuti, povrch tuhých elektrod je nehomogenní a neustále se mění, díky interakcím se složkami roztoku. Pro dosažení reprodukovatelných výsledků je nutné striktně dodržovat předepsané postupy a zásady práce s tuhými elektrodami, především postupy vedoucí k obnovování povrchu mezi jednotlivými analýzami (Markušová, 2000; Švancara, 2006).

2.2.3.2.1 Kovové elektrody

Pro konstrukci tuhých elektrod se používají kovové materiály jako platina, zlato, měď či borem dopovaný diamant (Švancara, 2006; Berek, 2006). Kovové elektrody se musí elektrochemicky čistit a aktivovat. Elektrochemické čištění a aktivace spočívá v cyklické změně potenciálu elektrody mezi kladnými a zápornými hodnotami, které vedou ke generování vodíku na elektrodě. Pro každý kovový materiál, z něhož je elektroda zhotovena, se musí nalézt nejúčinnější způsob čištění individuálně (Markušová, 2000).

2.2.3.2.2 Uhlíkové elektrody

Hlavní výhoda uhlíkových elektrod spočívá v jednoduchém a snadném čištění jejího povrchu (Yosypchuk, 2006). Čištění lze provádět pomocí jemného metalografického nebo brusného papíru, kdy je povrch elektrody obroušen. Elektrodový povrch lze očistit také pomocí suspenze oxidu hlinitého. Nevýhodou uhlíkových elektrod je to, že způsobují komplikace při měření svou pórovitostí. Pórovitost má za následek např. zadržování roztoku či špatnou reprodukovatelnost měřeného signálu. Těmto komplikacím, jež jsou spojené s pórovitostí uhlíku, lze předejít použitím elektrody z málo porézního pyrolytického grafitu nebo elektrody ze skelného uhlíku. Pórovitost lze také snížit impregnací elektrody např. cerezínem (Markušová, 2000).

- **Elektroda z pyrolytického grafitu** (PGE – *pyrolythic graphite electrode*)

Při použití této elektrody je po každém elektrochemickém měření nutné její povrch očistit od neadsorbovaných částic a elektrolytických produktů, často pomocí lepící pásky. Povrch je poté nutné opláchnout v destilované vodě a osušit. Výhodou této elektrody je fakt, že ji lze připravit také přímo v laboratoři s využitím dvousložkového tmelu. Její výroba není nijak finančně a časově náročná (Goyal a kol., 2008).

- **Elektroda ze skelného uhlíku** (GCE - *glassy carbon electrode*)

Skelný uhlík je velmi oblíbený elektrodový materiál, především právě pro svoje vynikající mechanické a vodivostní vlastnosti, široký potenciálový interval a dobře reprodukovatelné výsledky. Nevýhodou skelného uhlíku je jeho citlivost na přechod velkých proudů a poměrně rychle „stárne“ (rekrytalizuje se na grafit), čímž narůstá šum a snižuje se reprodukovatelnost měření (Markušová, 2000; Švancara 2006).

Skelný uhlík se připravuje z předmodelovaných polymerních fenolformaldehydových živic opatrným zahříváním v inertní atmosféře. Proces probíhá při teplotě 300–1200 °C, přičemž se ze živice odstraní kyslík, dusík a vodík. Díky svým vlastnostem jako je vysoká hustota a malá velikost pórů nevyžaduje skelný uhlík žádnou impregnaci. Jeho povrch se čistí leštěním postupně stále jemnější suspenzí oxidu hlinitého nebo diamantovým sprejem (Markušová, 2000). Výhodou této elektrody je fakt, že může být dlouhodobě používána i v prostředí s vysokým obsahem organického rozpouštědla (Barek, 2006).

- **Elektroda ze síťovaného skelného uhlíku** (RVCE – *reticulated vitreous carbon electrode*)

Tento elektrodový materiál našel uplatnění především v průtokové analýze a spektroelektrochemii. Díky vysoké pórovitosti má velmi velký povrch (Markušová, 2000).

- **Parafinem impregnovaná grafitová elektroda** (PIGE – *paraffin impregnated graphite electrode*)

Elektroda PIGE se připravuje impregnací porézní grafitové elektrody parafinem ve vakuu. Pro přípravu je důležitá především čistota parafínu. Do pórů nedokonale impregnované elektrody se může během měření dostat elektrolyt a taková elektroda tudíž není schopna poskytnout správné výsledky (Markušová, 2000).

- **Uhlíková pastová elektroda** (CPE – *carbon paste electrode*)

Elektrody z uhlíkové pasty patří mezi poměrně často používané. Uhlíková pasta je připravena homogenizací práškového uhlíku a organického rozpouštědla (nejčastěji silikonový olej) (Markušová, 2000). Tělo elektrody (plastová trubice) se naplní uhlíkovou pastou pomocí pístu, kterým je vytlačena pasta za účelem obnovení povrchu. Čerstvý povrch je zarovnan nožem a vyleštěn na lesklém, hladkém papíru. Elektrodu lze snadno chemicky modifikovat přidávkem modifikátoru (př. enzymy) k uhlíkovému prášku, pastovací kapalině či modifikací kompletně připravené uhlíkové pastové elektrody. Nevýhodou CPE je, že se dá použít pouze ve vodném prostředí (Barek 2006; Švancara, 2006).

- **Uhlíková vosková elektroda** (CWE – *carbon wax electrode*)

Uhlíkový vosk jako elektrodový materiál vznikne tehdy, když je místo kapalného organického rozpouštědla používaného při přípravě uhlíkové pasty, použito tuhé pojivo např. parafin. Oproti uhlíkové pastě má uhlíkový vosk výhodu v tom, že se dá jeho povrch lépe vyčistit a tedy se zvyšuje reprodukovatelnost výsledků (Markušová, 2000; Švancara 2006).

2.2.3.3 Srovnání tuhých a rtuťových elektrod

Výhodou tuhých elektrod oproti rtuťovým je poměrně vysoká hodnota přepětí kyslíku, takže

je možné sledovat elektrochemické děje v anodické oblasti až do oblasti +1,2 V, kdy v anodické oblasti pozorujeme oxidační píky (Yosypchuk, 2006; Vacek a kol., 2006).

Nevýhodou tuhých elektrod je fakt, že práce s nimi je experimentálně náročnější než práce s rtuťovými kapajícími elektrodami (Markušová, 2000) a na rozdíl od rtuťové elektrody je třeba povrch elektrod z tuhých materiálů před každým měřením očistit (Yosypchuk, 2006).

Výhodou rtuťových elektrod je lehce obnovitelný a vysoce reprodukovatelný povrch. Neustále obnovování povrchu rtuťové elektrody v průběhu měření představuje výhodu oproti elektrodám z tuhých materiálů, protože eliminuje problémy související s pasivací povrchu elektrody. (Yosypchuk, 2006; Markušová, 2000). Jak již bylo řečeno dříve, rtuťové elektrody umožňují vlivem vysokého přepětí vodíku, sledovat děje v katodické oblasti až do -2,6 V, kdy v katodické oblasti jsou sledovány píky redukční (Markušová, 2000; Vacek a kol., 2006). Potenciálové rozsahy některých elektrod jsou uvedeny v tabulce 1.

Tab. 1 – Potenciálové intervaly tuhých a rtuťových elektrod.

Typ elektrody	Potenciálový interval (V) vs. SCE	
	katodický	anodický
GCE	-0,8	+1,2
PGE	-1,5	+1,2
CPE	-1,6	+1,1
Platinová	-0,5	+1,2
Rtuťová	-2,6	+0,4
MFE	-1	+0,4

2.2.4 Studium mechanismu oxidace a antioxidační kapacity v praxi

Oxidační mechanismus nízkomolekulárních látek a biomakromolekul lze studovat řadou elektrochemických metod. Mezi nejpoužívanější patří metoda diferenčně pulzní voltametrie (DPV), cyklické voltametrie (CV) a voltametrie s vkládaným pravoúhlým napětím (SWV) (Zatloukalová a kol., 2011). Látka přítomná v elektrolytu je za určitých podmínek schopna odevzdávat elektrony. Je tedy oxidována nebo je schopná je přijímat a je redukována (Vacek a kol., 2006).

Antioxidační kapacita je závislá na velikosti oxidačního potenciálu (E_p). Pokud se pík

měřené látky nachází v oblasti s nízkou hodnotou oxidačního potenciálu ($E_p = 200$ mV), signalizuje efektivní antioxidant. Je-li naopak naměřený pík v oblastech se zvyšující se hodnotou oxidačního potenciálu, klesá antioxidační kapacita u zkoumané látky (Zatloukalová a kol., 2011).

V tabulce 2 je souhrně vyjádřena velikost antioxidačního potenciálu v závislosti na velikosti oxidačního potenciálu.

Tab. 2 – Velikost antioxidační kapacity v závislosti na oxidačním potenciálu.

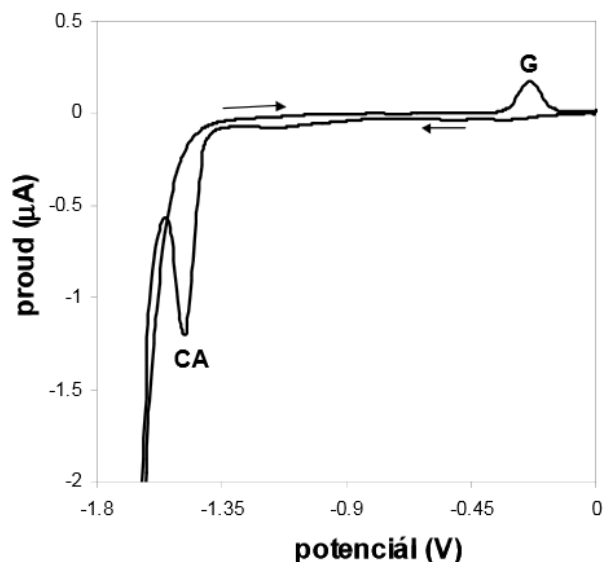
E_p (mV)	Antioxidační kapacita
0 - 200	Silný antioxidant
200 - 350	Slabý antioxidant
350 a více	Nízká

2.2.5 Elektrochemická analýza nukleových kyselin

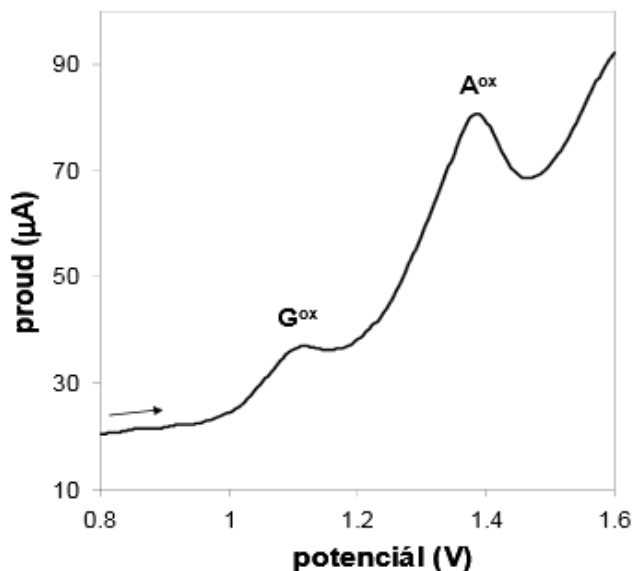
Elektrochemická analýza nukleových kyselin je využívána zejména pro studium oxidace a redukce DNA, interakce DNA s ligandy a pro studium poškození struktury DNA. Elektroaktivními složkami nukleových kyselin jsou dusíkaté báze. Adenin (A), cytosin (C) a guanin (G) patří mezi báze redukovatelné, zatímco oxidovatelné jsou jen adenin a guanin. Redukci adeninu a cytosinu lze pozorovat pouze pomocí amalgámových nebo rtuťových elektrod, protože k redukci dochází při značně negativních potenciálech. Na ostatních elektrodách dochází k vylučování vodíku, jenž elektrochemické měření neumožňuje (Vacek a kol., 2006, Barek a kol., 2006).

Redukcí adeninu a cytosinu vzniká pouze jeden pík (při potenciálu -1,5), označován jako CA pík (cytosin + adenin) viditelný na obrázku 6. Oxidaci purinových bází adeninu a guaninu znázorňuje obrázek 7.

Obr. 6 – Cyklický voltamogram oligonukleotidu s redukčním píkem cytosinu a adeninu (CA) a oxidačním píkem guaninu, který odpovídá oxidaci redukčního produktu guaninu, který vznikl při negativních potenciálech ~ -1,7 V (Vacek a kol., 2006).



Obr. 7 – Square wave voltamogram oligonukleotidu s oxidačním píkem adeninu a guaninu v pozitivních potenciálech (v případě guaninu od +1,0 do +1,1 V, v případě adeninu od +1,2 do +1,3 V). (Vacek a kol., 2006).



Oxidaci pyrimidinových bází, thyminu (T) a cytosinu (C) lze detekovat při pozitivnějších potenciálech, kolem +1,3 až +1,4 V. V závislosti na typu elektrody nejsou oxidační píky pyrimidinových bází v polynukleotidovém řetězci obvykle pozorovatelné. K analýze jsou proto

využívány výhradně oxidační píky purinů. Oxidaci těchto bází lze měřit pomocí uhlíkových elektrod (Vacek a kol., 2011).

Obecně lze tedy říci, že elektrochemické chování nukleových kyselin je závislé na komunikaci bází s povrchem elektrody prostřednictvím oxidačního či redukčního mechanismu. Ostatní báze jsou v nativní DNA skryty uvnitř dvoušroubovice, kde spojují na základě pravidel komplementarity oba polynukleotidové řetězce a nemohou tedy volně komunikovat s povrchem elektrody. Zatímco v denaturované DNA jsou řetězce volně přístupné. Elektrochemické odezvy denaturované a nativní DNA se tedy výrazně liší (Vacek a kol., 2006, Berek a kol., 2006).

3. CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo vypracování literární rešerše na téma elektrochemie flavonolignanů a jejich interakce s DNA dále studium oxidačních mechanismů flavonolignanů (SB, DHSDB, SCH, DSCH, SD, DHSD) a konstrukce uhlíkových elektrod. Tato diplomová práce byla zaměřena také na výzkum reaktivity flavonolignanů ve vodném prostředí při pH 7,4, výzkum interakce flavonolignanů s DNA, antioxidační kapacity a prooxidačních účinků, přípravu komplexů flavonolignan/kov a vzájemné porovnání výsledků z elektrochemické a elektroforetické analýzy z hlediska antioxidačních, oxidačních a prooxidačních vlastností flavonolignanů.

4. MATERIÁL A METODIKA

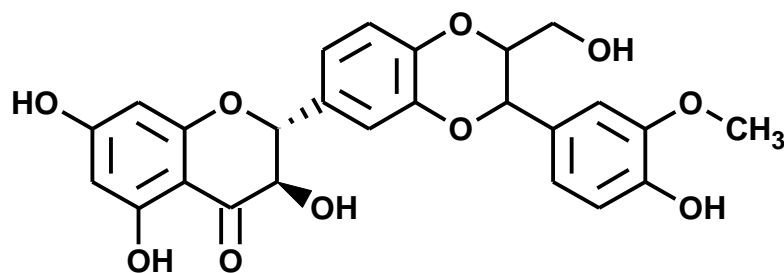
4.1 Chemikálie

Pro elektrochemické analýzy byly použity flavonolignany – silybin (SB), silychristin (SCH) a silydianin (SD) (Obr. 8) a jejich 2,3-dehydroderiváty dehydrosilybin (DHSB), dehydrosilychristin (DHSCH) a dehydrosilydianin (DHSB) (Obr. 9).

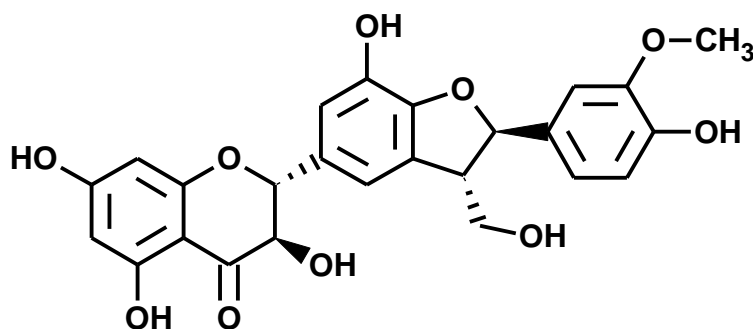
Flavonolignany jsou řazeny do skupiny flavonoidů, které patří spolu s isoflavonoidy a antokyanidiny do skupiny látek souhrnně označovaných jako polyfenoly. Zmíněné flavonolignany se přirozeně vyskytují v rostlině ostropestřec mariánský *Silybum marianum* (L.) Gaertn.

Obr. 8 – Struktury látek - silybin, silychristin, silydianin.

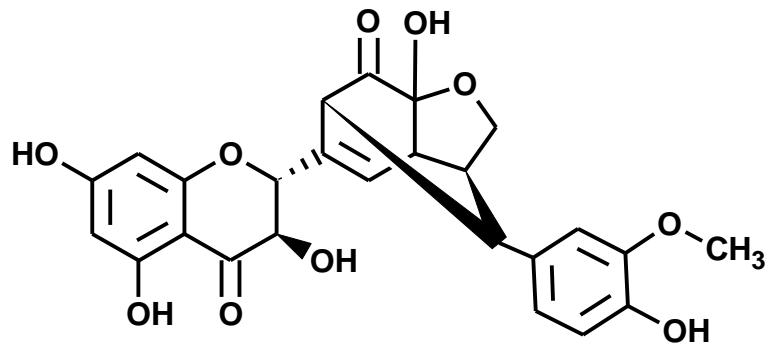
1) Silybin



2) Silychristin

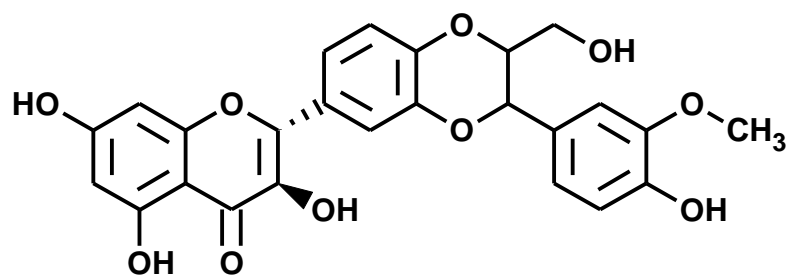


3) Silydianin

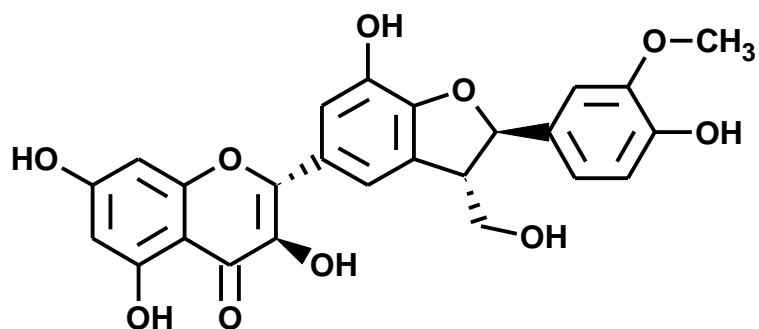


Obr. 9 – Struktury dehydroderivátů - dehydrosilybin, dehydrosilychristin, dehydrosilydianin.

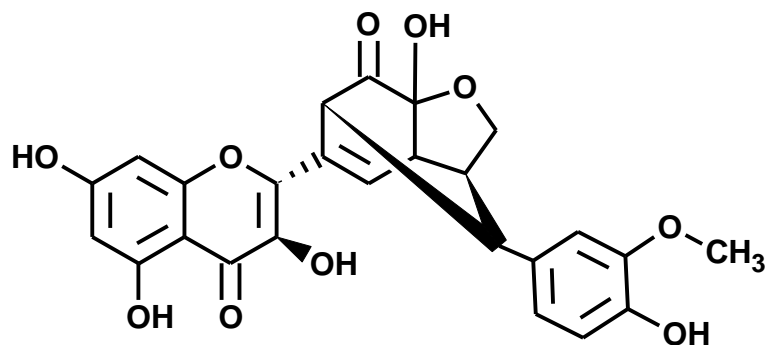
1) 2,3-Dehydrosilybin



2) 2,3-Dehydrosilychristin



3) 2,3-Dehydrosilydianin



4.1.1 Složky nutné pro konstrukci pyrolytické grafitové elektrody (PGE)

- 1) pipetové špičky
- 2) pyrolytický grafit (10x3x3 mm)
- 3) dvousložkový tmel Torr Seal (Labicom)
- 4) měděný drátek (cca 10 cm)
- 5) UHU epoxidová pryskyřice
- 6) elektrovodivý lak EL-1 (ELCHEMCo)
- 7) skalpel
- 8) parafilm

4.1.2 Složení tlumivých vodných roztoků

Všechny komponenty pro přípravu pufrů byly dodány společností Sigma –Aldrich.

1) Acetátový pufr pH 5, 200 ml

0,2M CH₃COOH (59 ml)

0,2M CH₃COONa (141 ml)

2) Britton-Robinsonův pufr pH 7,4; 1l

80% H₃PO₄ (4,9 g)

0,04M CH₃COOH (2,4 g)

0,04M H₃BO₃ (2,474 g)

0,2M NaOH (56,25 ml)

destilovaná voda (doplnit na objem 1l)

4.1.3 Látky použité na tvorbu komplexu flavonolignan/kov

Flavonolignany: silybin (SB) (J. Cvak, Teva Galena, Opava, ČR)

2,3-dehydrosilybin (DHSB) (1,04 mM)

silychristin (SCH) (Křenek K. a kol., Preparatory separation of the silymarin complex flavonolignans by Sephadex LH-20 gel, Food Research International, ...2014)

silydianin (SD) (Křenek K. a kol., Preparatory separation of the silymarin

complex flavonolignans by Sephadex LH-20 gel, Food Research International,2014)

dehydrosilydianin (DHSD)

Dehydroderiváty DSB, DHSCH, DHSD byly připraveny oxidací kyslíkem v přítomnosti pyridinu při 80 °C.

Methanol (Sigma-Aldrich)

FeCl₃ (Sigma-Aldrich)

0,2 M NaCl (Sigma-Aldrich)

4.1.4 Příprava látek pro elektroforézu a studium jejich prooxidačních vlastností

1) oligonukleotid (ODN) GC 87: 5' CCG CGC GCC ACG CTG GGG GAC CTC GGG GCC 3' (VBC Biotech, AT).

V tabulce 3 jsou uvedeny podrobnější údaje o oligonukleotidu GC 87.

Tab. 3 – Charakteristika oligonukleotidu GC 87.

GC 87 (30-mer)	
Molekulová hmotnost (g/mol)	9212
Teplota tání (°C)	87,6
Obsah bází GC (%)	86,7
Zastoupení jednotlivých bází	A-2,G-13,C-13,T-2

Po naředění ODN 100x, bylo proměřeno absorpční spektrum a odečtena absorbance v maximu tj. při 260 nm. Dále byla vypočítána koncentrace ODN v původním roztoku tj koncentrace ODN = 1,6863 mg/ml.

2) Fe-komplexy flavonolignanů (SB, DHSB, SCH, DHSCH, SD, DHSD)

3) 3% Peroxid vodíku (H₂O₂) (Sigma-Aldrich)

4) Fe³⁺ (FeCl₃)

5) Hovězí sérový albumin - BSA (Sigma-Aldrich)

Tabulka 4 uvádí koncentrace všech látek ve vzorcích.

Tab. 4 – Koncentrace látek ve vzorku.

ODN	50 µg/ml
ODN + Fe ³⁺	ODN:50 µg/ml; Fe ³⁺ : 5 µM
ODN + H ₂ O ₂	ODN:50 µg/ml; H ₂ O ₂ : 3%
ODN + Fe ³⁺ + H ₂ O ₂	ODN:50 µg/ml; Fe ³⁺ : 5 µM, H ₂ O ₂ : 3%
ODN+komplex (flavonolignan/Fe)	ODN:50 µg/ml; komplex (10 µM flavonolignan: 5µM Fe)
ODN+komplex(flavonolignan/Fe) +H ₂ O ₂	ODN:50 µg/ml; komplex (10 µM flavonolignan: 5µM Fe), H ₂ O ₂ : 3%
ODN+komplex(flavonolignan/Fe)+ H ₂ O ₂ + BSA	ODN:50 µg/ml; komplex (10 µM flavonolignan: 5 µM Fe), H ₂ O ₂ : 3%; BSA: 10 µM

4.1.5 Příprava tlumivého roztoku 10x TBE pro elektroforézu

Pro přípravu 1l 10x TBE pufru je potřeba:

TRIS (108g)

H₃BO₃ (55g)

EDTA (9,32g)

H₂O₂ (doplnit na objem 1l)

4.1.6 Příprava polyakrylamidového gelu

40% roztok monomeru (akrylamid/bisakrylamid v poměru 29:1) (4 ml)

destilovaná voda (3,7 ml)

10 x TBE (pH 8,3) (2,6 ml)

10% amonný persulfát (100 μ l)

tetramethylethyldiamin (10 μ l)

Smícháním všech těchto složek je připraven PAA gel pro gelovou elektroforézu.

4.1.7 Barvení PAA gelu 0,02% metylenovou modří

0,02% metylenová modř (20 g)

10 x TBE (1ml)

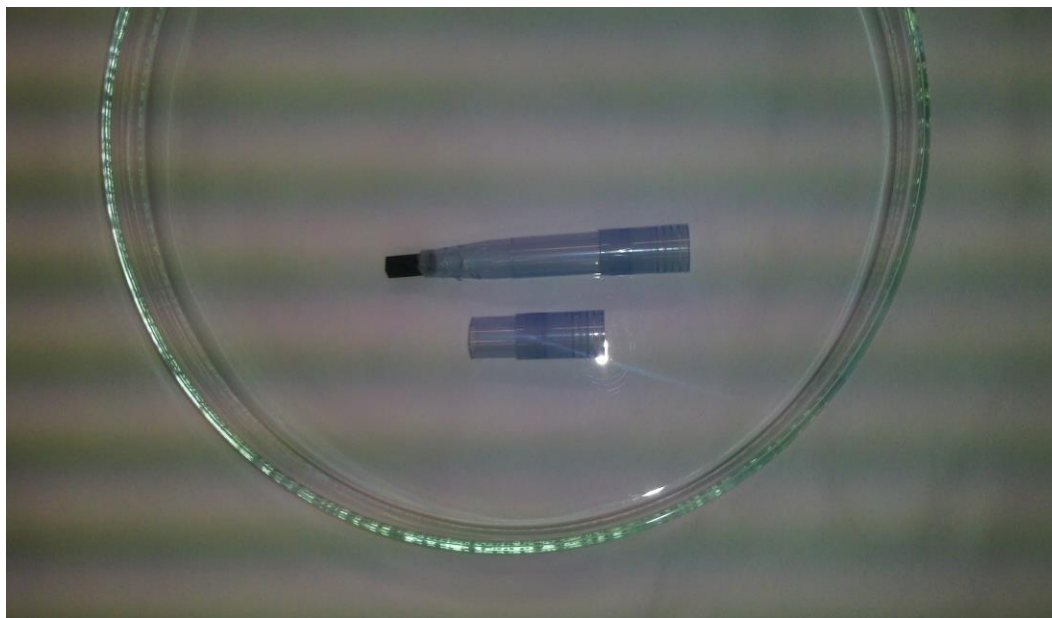
H₂O₂ (doplnit na objem 100 ml)

4.2 Použité metody

4.2.1 Konstrukce pyrolytické uhlíkové elektrody

Z pipetové špičky se nejdříve vytvoří „tělo“ elektrody. Do seříznuté špičky je vložen pyrolytický grafit, který je upevněn parafilmem. Další špička je potřebná při nanášení tmelu na grafit (Obr. 10).

Obr. 10 – Plastový materiál s grafitem potřebný pro konstrukci „těla“ elektrody (foto autorka).



Následně je na tuto plastovou část s uhlíkem nasazena kratší část „těla“ elektrody (Obr.11).

Obr. 11 - „Tělo“ pracovní elektrody (foto autorka).



Další krok zahrnuje přípravu dvousložkového tmelu, kdy jednotlivé složky tmelu jsou smíchány v poměru 2:1. Takto připravený tmel se ihned aplikuje na grafit a nechá se tuhnout min. 24 hodin. Poté co tmel ztuhne, se kratší část „těla“ elektrody odstraní skalpelem. Přebytečný bílý tmel se obrousí na smirkovém papíru, tak aby byl vidět povrch uhlíku. Do „těla“ elektrody na povrch pyrolytického grafitu je nanášeno cca 200 μ l elektrovedivého laku, ředěného etanolem. Jakmile je nanášeno lak, je do „těla“ elektrody vložen měděný drátek s konci ořezanými tak, aby byl vytvořen kontakt. Pro upevnění drátku se použije kousek špičky a nechá schnout 60 minut (Obr.12).

Obr. 12 – Zkonstruovaná PG elektroda (foto autorka).



Poté se měděný drátek stabilizuje lepidlem UHU a nechá opět zaschnout. PGE elektroda je připravena pro elektrochemické měření.

Před každým elektrochemickým měřením je nutné elektrodu důkladně očistit od naadsorbovaných částic a produktů elektrolýzy.

4.2.2 Příprava pufrů

1) Britton-Robinsonův pufr pH 7,4

Pro přípravu tohoto tlumivého roztoku bylo smícháno 100 ml roztoku [80% H_3PO_4 (4,9 g) 0,04 M CH_3COOH (2,4 g) 0,04 M H_3BO_3 (2,474 g)] s 0,2M NaOH (56,25 ml). Po smíchání byl pufr doplněn do celkového objemu 0,5 l odpovídajícím množstvím destilované vody. pH pufru bylo zkontrolováno pomocí pH metru.

2) Acetátový pufr pH 5

200 ml acetátového tlumivého roztoku o pH 5 bylo připraveno smícháním 59 ml 0,2 M CH_3COOH s 141 ml 0,2 M CH_3COONa . pH tohoto pufru bylo rovněž zkontrolováno pomocí pH metru.

4.2.3 Příprava vzorků pro elektrochemickou analýzu

Na automatických vahách bylo naváženo přibližně po 1 mg každé látky (SB, SCH, SD, DHSB, DHSCH, DHS). Navážené množství látky bylo rozpuštěno v odpovídajícím množství methanolu, tak aby výsledná koncentrace látek v roztoku byla 1mg/ml.

4.2.4 Aplikace vzorku na povrch pracovní elektrody

4.2.4.1 *Ex situ*

Na povrch pracovní elektrody (PGE) bylo aplikováno vždy 5 μ l roztoku zkoumané látky, který byl adsorbován 60 s. Poté byla elektroda opláchnuta v deionizované vodě. Po opláchnutí elektrody proběhlo elektrochemické měření v čistém základním elektrolytu v elektrochemické cele. Pro vytvoření zásobního roztoku bylo potřeba naředit rozpuštěnou látku pufrům. K ředění roztoku byl použit 0,2 M acetátový pufr pH 5. Aby bylo možné naředit zásobní roztok na finální koncentraci 50 μ M a vytvořit tak roztok základní, bylo nutné spočítat molární koncentraci látky. U všech látek byly základní parametry [navážka (+/-1mg), finální koncentrace (50 μ M), relativní molekulová hmotnost (482 g/mol; 480 g/mol), objem základního roztoku (1ml)] přibližně stejné, tudíž lze říci, že k vytvoření roztoků bylo vždy třeba 24 μ l zásobního roztoku dané látky a 976 μ l 0,2 M acetátového pufru pH 5.

4.2.4.2 *In situ*

Do elektrochemické cely bylo nejprve aplikováno 10 ml základního elektrolytu BR (pH 7,4) a poté 24 μ l metanolickeho roztoku látky, aby výsledná koncentrace flavonolignanů v základním elektrolytu byla 5 μ M. Poté proběhla adsorbce látky (60 s) na povrch PGE a bylo provedeno elektrochemické měření.

Každá látka byla změřena 3 x za podmínek *in situ* i *ex situ* pomocí obou metod (CV, SWV).

4.2.5 Elektrochemické měření flavonolignanů

Před samotnou elektrochemickou analýzou jednotlivých flavonolignanů, byl nejprve proměřen samotný základní elektrolyt (BR pH 7,4). Nejprve byl zapnut počítač a přístroj μ Autolab III analyzer (EcoChemie, NL), dále byl spuštěn software GPES a zapojena elektrochemická cela

využívající tříelektrodový systém, který je složený z elektrody pracovní (PGE), referenční (Ag/AgCl/3M KCl) a pomocné (platinový drátek). Po ověření čistoty základního elektrolytu, byl analyzován vzorek příslušného flavonolignanů.

Flavonolignany byly měřeny pomocí *in situ* (aplikace vzorku do základního elektrolytu) a *ex situ* (adsorbce vzorku na povrchu elektrody) voltametrie. Pro elektrochemické měření látek byly využity dvě metody: CV (cyklická voltametrie) a SWV (voltametrie s vkládaným pravoúhlým napětím). Individuální nastavení parametrů pro každou z metod je uvedeno v následující legendě:

A) Podmínky CV experimentu: adsorpce – 60 s, koncentrace látek - 50 μM (rozpuštěno v 0,2 M acetátovém pufru pH 5.0), elektrolyt: Britton-Robinson pufr (pH 7,4), CV parametry: počáteční potenciál (0 V), potenciál obratu (+1.5 V), konečný potenciál (0 V), rychlost skenu 1 V s^{-1} .

B) Podmínky SWV experimentu: adsorpce - 60 s, koncentrace látek - 50 μM (rozpuštěno v 0,2 M acetátovém pufru pH 5.0), elektrolyt: Britton-Robinson pufr (pH 7,4), SWV parametry: počáteční potenciál (0 V), konečný potenciál (+1.5 V) potential, frekvence 200 Hz, amplituda 25 mV.

4.2.6 Zpracování dat

Pomocí programu GPES a Microsoft Office Excel byly data z elektrochemického měření zpracována do grafů.

4.2.7 Tvorba komplexů flavonolignan/kov

Nejprve bylo naváženo 0,5 mg každého flavonolignanů, který byl rozpuštěn v 1 ml methanolu, kdy 0,5 mg/ml odpovídá koncentraci 1,036 mM. 1 mg FeCl_3 byl rozpuštěn v 1 ml H_2O . Po jeho rozpuštění byl zásobní roztok Fe^{3+} naředěn na koncentraci 385 μM . Poté co byl flavonolignan i FeCl_3 naředěn na požadovanou koncentraci byl vytvořen komplex flavonolignan/kov (50 μM :25 μM) v prostředí 0,2 M NaCl. Objemy pipetované pro vytvoření komplexu flavonolignan/kov v poměru 2:1 jsou uvedeny v tabulce 5.

Tab. 5 – Vytvoření komplexu flavonolignan/Fe.

Pro přípravu komplexů byl použit zásobní roztok 1,036 mM resp. 1,04 mM flavonolignanů a 385 μM FeCl_3 .

2:1 Flavonolignan: kov	Fe^{3+} (μl)	SB (μl)	DHSB (μl)	SCH (μl)	DHSCH (μl)	SD (μl)	DHSD (μl)	0.2 M NaCl (μl)
komplex SB/Fe	32.47	48.26						919.27
komplex DHSB/Fe	32.47		48.04					919.49
komplex SCH/Fe	32.47			48.26				919.27
komplex DHSCH/Fe	32.47				48.04			919.49
komplex SD/Fe	32.47					48.26		919.27
komplex DHSD/Fe	32.47						48.04	919.49

4.2.8 Příprava vzorků pro studium interakce flavonolignanů s DNA a jejich prooxidačních efektů

Pro studium interakce flavonolignanů s DNA a jejich prooxidačních vlastností bylo celkem připraveno 22 vzorků. Tabulka 6 uvádí množství všech složek, které byly použity na přípravu vzorků pro gelovou elektroforézu.

Tab. 6 – Příprava vzorků.

Číslo vzorku	Chemikálie	komplex (μl)	Fe ³⁺ (μl)	BR pufr (pH=7,4) (μl)	ODN (μl)	BSA (μl)	H ₂ O ₂ (μl)
1	ODN	-	-	48,6	1,4	-	-
2	ODN + Fe ³⁺	-	0,64	47,96	1,4	-	-
3	ODN + H ₂ O ₂	-	-	43,6	1,4	-	5
4	ODN + Fe ³⁺ + H ₂ O ₂	-	0,64	42,96	1,4	-	5
5 (a-f)	ODN+komplex (flavonolignan/Fe)	10	-	38,6	1,4	-	-
6 (a-f)	ODN+komplex (flavonolignan/Fe) +H ₂ O ₂	10	-	33,6	1,4	-	5
7 (a-f)	ODN+komplex (flavonolignan/Fe) + BSA + H ₂ O ₂	10	-	30,3	1,4	3,3	5

(a-f) – označení pro jednotlivé flavonolignany a - SB, b – DHSB, c – SCH, d – DHSCH, e – SD, f – DHSD

Nejprve byl inkubován ODN s komplexem flavonolignan/Fe 10 minut při teplotě 37 °C Poté byl do reakční směsi přidán BSA (inkubace 10 minut) a nakonec H₂O₂. Všechny vzorky byly opět inkubovány při teplotě 37 °C 10 minut.

4.2.9 Gelová elektroforéza

Připravené vzorky obsahující 50 μg DNA/ml byly smíchány s činidlem 6 x „Loading dye“ (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc.) v poměru 5:1 a ponechány v termostatu po dobu 2 min při teplotě 90 °C. Po zahřátí byly vzorky separovány v 15% polyakrylamidovém gelu. Pro separaci vzorků gelovou elektroforézou bylo do jednotlivých jamek nanášeno 20 μl vzorků. Elektroforéza byla provedena v 1 x TBE pufru při konstantním napětí 150 V po dobu 1-1,5 hodiny. Gel byl obarven pomocí 0,02% metylenové modře a následně odbarven destilovanou vodou. Gel byl naskenován a intenzita jednotlivých proužků byla vyhodnocena pomocí programu Image J software (verze 1.4).

5. VÝSLEDKY

Flavonolignany rozpuštěné v metanolu byly naředěny na požadovanou koncentraci pomocí 0,2 M acetátového pufru pH 5. Reaktivita flavonolignanů související s jejich antioxidačními, prooxidačními vlastnostmi a interakcí s DNA byla studována v podmínkách *ex situ* (aplikace a adsorbce vzorku na povrch pracovní elektrody) a *in situ* (aplikace vzorku do základního elektrolytu) v přítomnosti 0,2 M Britton-Robinsonova pufru (pH 7,4) pomocí metod CV a SWV. Všechny výsledky elektrochemických analýz flavonolignanů jsou uvedeny v kapitole 10 Přílohy.

Silybin adsorbovaný na povrchu PGE poskytuje v podmínkách *ex situ* i *in situ* dva oxidační píky. S využitím obou metod při pH 7,4 je potenciál prvního píku (Ep_1) pozorován vždy kolem hodnoty +0,5 V. Ep_2 pak odpovídá hodnotě +0,8 V. CV a SWV silybinu v podmínkách *ex situ* ukazuje obrázek 14. Na obrázku 15 jsou ukázány voltamogramy silybinu za podmínek měření *in situ*. Pík 1 je spojen s oxidací OH skupiny v poloze C-20 na kruhu E. Pík 2 u silybinu a pík 3 u 2,3-dehydrosilybinu byl naměřen při přibližně stejných hodnotách potenciálu. Oba uvedené píky jsou pravděpodobně spojeny s oxidací hydroxylové skupiny (či hydroxylových skupin) resorcinolového kruhu A. Nejnižší naměřený oxidační potenciál silybinu Ep_1 +0,518 V koresponduje s jeho relativně nízkou antioxidační kapacitou. Na obr. 16 je možné vidět tři voltametrické oxidační píky, které vykazuje v podmínkách *ex situ* flavonolignan 2,3-dehydrosilybin. Obrázek 17 znázorňuje výsledky *in situ* elektrochemické měření 2,3-dehydrosilybinu. Pík 1 při hodnotě Ep_1 +0,3 V souvisí s oxidací C-3 hydroxylové skupiny na kruhu C. V závislosti na velikosti potenciálu Ep_1 naměřeného pomocí SWV lze 2,3-dehydrosilybin považovat za relativně účinný antioxidant. Pík 2 u DHSB odpovídá podobně jako pík 1 u SB oxidaci hydroxylové skupiny C-20. Metoda cyklické voltametrie nebyla při stanovení přesné hodnoty Ep_1 tak citlivá jako metoda voltametrie s vkládaným pravoúhlým napětím. Grafické znázornění *ex situ* voltamogramů silychristinu ukazuje obrázek 18. Na obrázku 19 jsou uvedeny CV a SWV voltamogramy silychristinu v podmínkách *in situ*. Pro silychristin byly za *in situ* podmínek naměřeny oběma metodami tři píky. Pík 1 silychristinu se pohybuje v hodnotách kolem +0,5 V, což poukazuje na oxidaci hydroxylové skupiny C-20 v aromatickém kruhu E. 2,3-dehydrosilychristin vykazuje při elektrochemickém měření celkem čtyři píky, které byly nejdetailněji naměřeny v podmínkách *ex situ* metodou SWV. *Ex situ* voltamogramy pro 2,3-dehydrosilychristin jsou ukázány na obrázku 20. Obrázek 21 znázorňuje měření 2,3-dehydrosilychristinu v podmínkách *in situ*. Ep_1 2,3-dehydrosilychristinu byl naměřen v hodnotách okolo +0,3 V, což poukazuje na to, že vykazuje výrazně vyšší antioxidační kapacitu než silychristin. Ve srovnání s ostatními flavonolignany se jeví za daných experimentálních podmínek jako nejlepší antioxidant. CV i SWV voltamogramy silydianinu v podmínkách *ex situ* jsou zobrazeny na obrázku 22. *In situ* voltamogramy znázorňuje obrázek 23. Z anodického píku 1 silydianinu v hodnotě +0,4

V můžeme opět usoudit na jeho antioxidační kapacitu. Lze předpokládat, že Ep_1 silydianinu souvisí s oxidací hydroxylové skupiny C-20 aromatického kruhu E. Pro 2,3-dehydrosilydianin byly změřeny dva píky při oxidačních potenciálech $Ep_1 +0,4$ V a $Ep_2 +0,8$ V. Na obrázku 24 jsou znázorněny *ex situ* voltamogramy. Obrázek 25 pak graficky znázorňuje voltametrické měření 2,3-dehydrosilydianinu v podmínkách *in situ*. Velikosti oxidačních potenciálů všech flavonolignanů měřených metodou cyklické voltametrie v podmínkách *ex situ* jsou ukázány v tabulce 7.

Tab. 7 – Oxidační potenciály flavonolignanů v podmínkách *ex situ* při pH 7,4, cyklická voltametrie.

Flavonolignan	Sumární vzorec	Molekulová hmotnost	Ep_1 (V)	Ep_2 (V)	Ep_3 (V)	Ep_4 (V)	Antioxidační účinek
silybin	$C_{25}H_{22}O_{10}$	482,44	0,518	0,850			↑↑
2,3-dehydrosilybin	$C_{25}H_{20}O_{10}$	480,44	0,366	0,509	0,840		↑↑↑
silychristin	$C_{25}H_{22}O_{10}$	482,12	0,493	0,594	0,853		↑↑
2,3-dehydrosilychristin	$C_{25}H_{20}O_{10}$	480,10	0,343	0,500	0,703	0,869	↑↑↑↑
silydianin	$C_{25}H_{22}O_{10}$	482,12	0,421	0,850			↑↑
2,3-dehydrosilydianin	$C_{25}H_{20}O_{10}$	480,44	0,412	0,895			↑↑↑

Naměřené oxidační potenciály flavonolignanů voltametrickou metodou s vkládaným pravoúhlým napětím v podmínkách *ex situ* znázorňuje tabulka 8.

Tab. 8 – Velikosti oxidačních potenciálů flavonolignanů v *ex situ* podmínkách při pH 7,4, voltametrie s vkládaným pravoúhlým napětím.

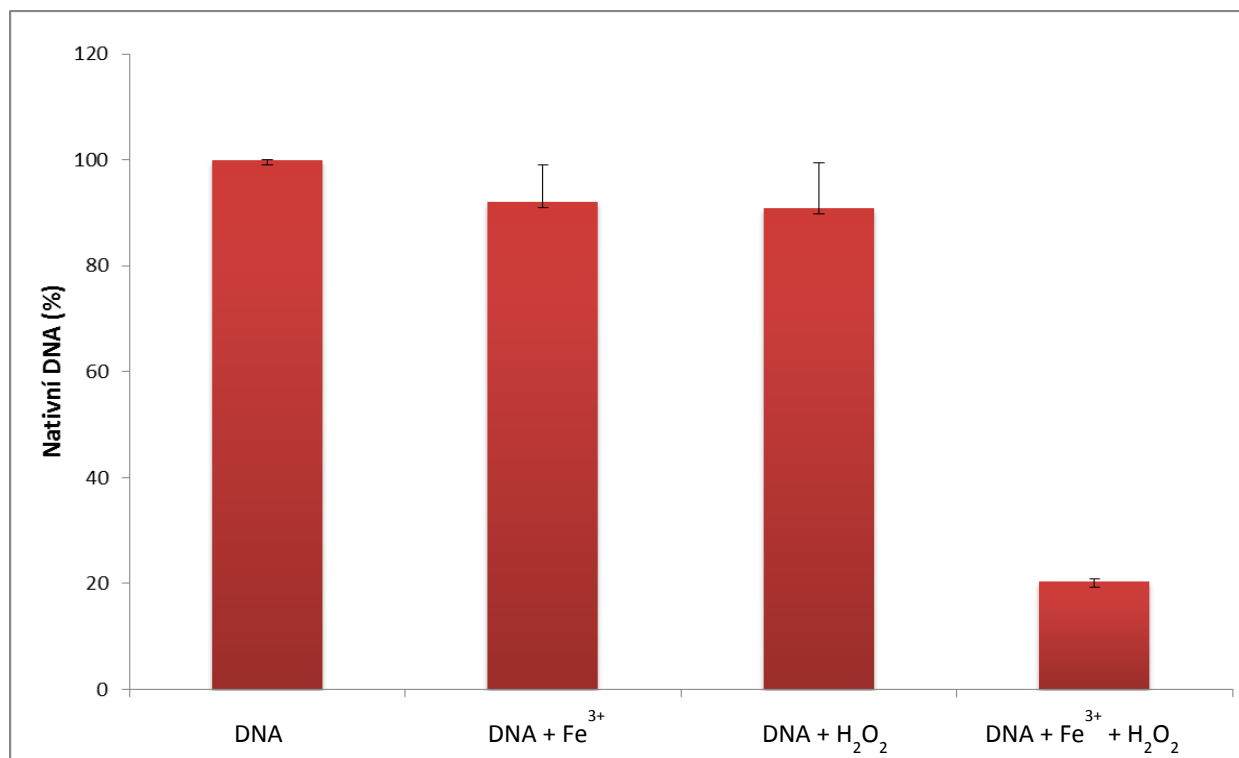
Flavonolignan	Ep_1 (V)	Ep_2 (V)	Ep_3 (V)	Ep_4 (V)	Síla antioxidace
silybin	0,528	0,830			↑↑
2,3-dehydrosilybin	0,327	0,537	0,811		↑↑↑↑
silychristin	0,480	0,631	0,873		↑↑
2,3-dehydrosilychristin	0,330	0,562	0,680	0,910	↑↑↑↑
silydianin	0,433	0,853			↑↑
2,3-dehydrosilydianin	0,410	0,874			↑↑↑

Ep – potenciál oxidace, výsledné hodnoty Ep_1, Ep_2, Ep_3, Ep_4 – naměřeny tři různé hodnoty pro každý oxidační pik – průměr těchto hodnot – výsledná hodnota Ep_1, Ep_2, Ep_3, Ep_4

Reaktivita a antioxidační vlastnosti studovaných látek jsou odvozovány z velikosti potenciálu prvního oxidačního píku v prvním anodickém skenu.

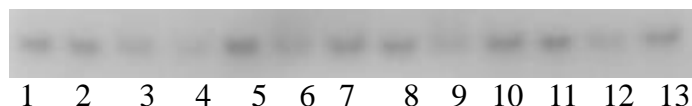
S využitím elektrochemických a elektroforetických metod byly dále studovány prooxidační efekty flavonolignanů a jejich interakce s DNA. Pomocí gelové elektroforézy jsou separovány a analyzovány makromolekuly (DNA, RNA a proteiny) v závislosti na jejich velikosti. Pro studium prooxidačních efektů flavonolignanů byly vytvořeny komplexy flavonolignan/kov. Po inkubaci komplexů s DNA v přítomnosti či absenci peroxidu vodíku bylo poškození DNA analyzováno pomocí PAGE a *ex situ* voltametrie s vkládaným pravoúhlým napětím. Výsledky demonstrují, že vytvořené komplexy způsobují fragmentaci DNA. Přítomnost sérového albuminu striktně potlačuje DNA poškozující efekty. Prooxidační efekty všech šesti vytvořených komplexů Fe-flavonolignan byly porovnány s prooxidačním efektem Fe^{3+} za přítomnosti H_2O_2 (Fentonova reakce). Graf 1 ukazuje procentuální úbytek nativní DNA po provedení PAGE vlivem Fe a H_2O_2 . První sloupec grafu zobrazuje 100% nativní DNA. Ve druhém sloupci je DNA ve vazbě s železem. Samotný kov nemá na fragmentaci DNA téměř žádný efekt. Stejně tak nemá samotný peroxid vodíku na DNA fragmentační účinky, jak je možno vidět ve třetím sloupci. Čtvrtý sloupec zobrazuje Fentonovu reakci, při které dochází k tvorbě hydroxylových radikálů a úplné degradaci DNA.

Graf 1 – Procentuální úbytek nativní DNA po vytvoření komplexů DNA s Fe^{3+} a H_2O_2 .



V následujících grafech a obrázcích je ukázána interakce všech komplexů flavonolignanů/Fe s DNA. Grafická znázornění zobrazují rovněž chybové úsečky ze směrodatných odchylek všech měření. V prvních a čtvrtých sloupcích všech grafů je detekována interakce vytvořeného komplexu flavonolignanů a kovu s DNA. Komplexy flavonolignanů a kovu byly v experimentu využity jako kontroly. Pozorování prooxidačních účinků komplexů na DNA v nepřítomnosti H_2O_2 vyžaduje interakci v delším časovém intervalu. Proto byly studovány prooxidační účinky flavonolignanů v přítomnosti H_2O_2 . Za přítomnosti H_2O_2 je prooxidační efekt komplexů významně usnadněn. Druhé a páté sloupce poukazují na interakci vytvořeného komplexu s DNA v přítomnosti peroxidu vodíku. Třetí a šesté sloupce demonstrují protektivní účinek BSA. V přítomnosti BSA je prooxidační efekt Fe-komplexů flavonolignanů výrazně potlačen. Obrázek 13 zobrazuje gel po elektroforetické separaci DNA po inkubaci s komplexem silybinu/Fe a 2,3-dehydrosilybinu/Fe, který byl následně vyhodnocen i graficky. V legendě pod obrázkem lze vidět pořadí jednotlivých vzorků aplikovaných do PAA gelu. Každý komplex byl do gelu aplikován 2x. Světlý proužek (jamka 4) u pozitivní kontroly demonstruje Fentonovu reakci, při níž dochází k úplné degradaci DNA. Další světlé proužky (jamky 6, 9) poukazují na poškozenou DNA vlivem působení komplexu silybinu/Fe a 2,3-dehydrosilybinu/Fe (jamka 12) a H_2O_2 .

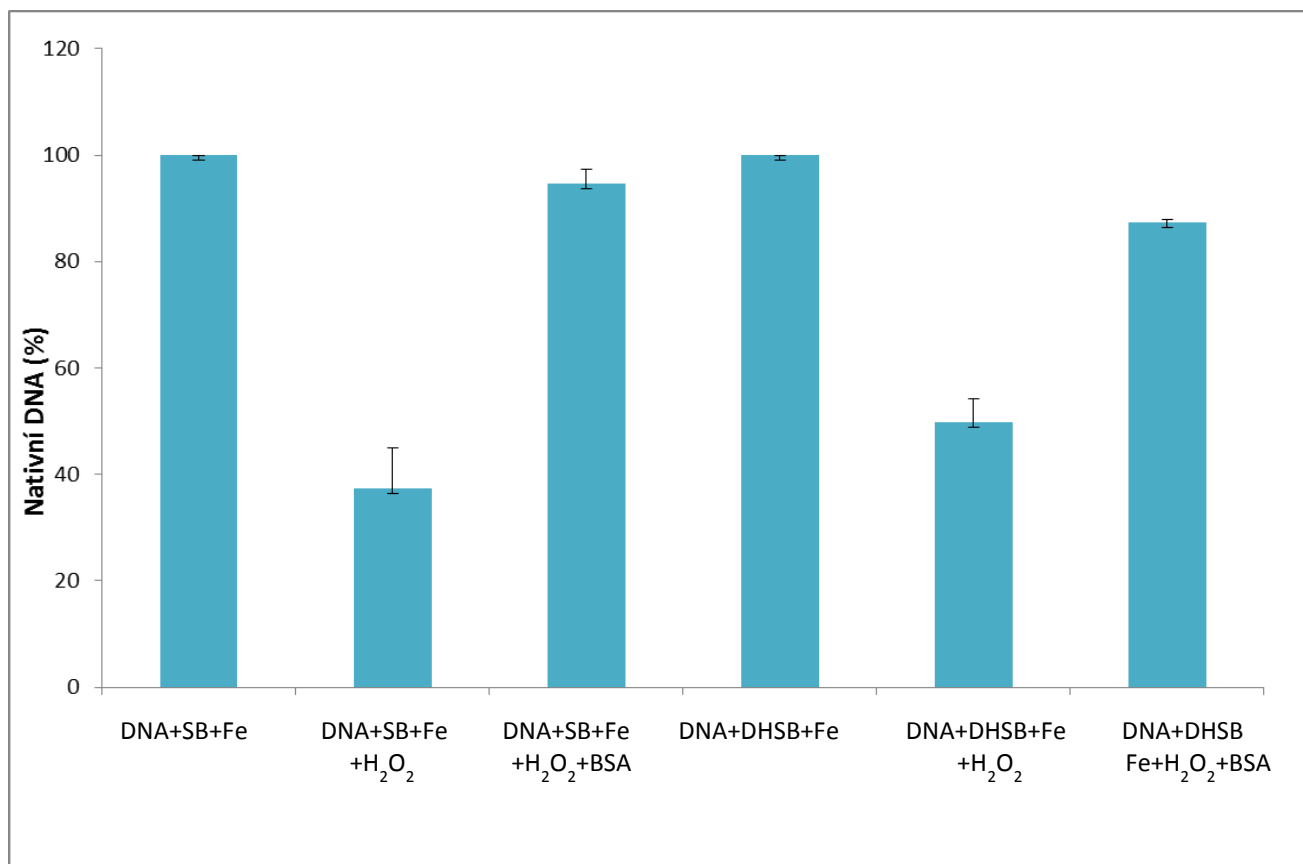
Obr. 13 – Vizualizace gelu po elektroforetické separaci komplexů silybinu/Fe a 2,3-dehydrosilybinu/Fe v přítomnosti a absenci H_2O_2 .



Legenda: 1) DNA 2) DNA+ Fe^{3+} 3) DNA+ H_2O_2 4) DNA+ H_2O_2 + Fe^{3+} 5) DNA+ SB + Fe 6) DNA + SB + Fe + H_2O_2 7) DNA + SB + Fe + H_2O_2 + BSA 8) DNA+ SB + Fe 9) DNA + SB + Fe + H_2O_2 10) DNA + SB + Fe + H_2O_2 + BSA 11) DNA + DHSB + Fe 12) DNA + DHSB + Fe + H_2O_2 13) DNA + DHSB + Fe + H_2O_2 + BSA

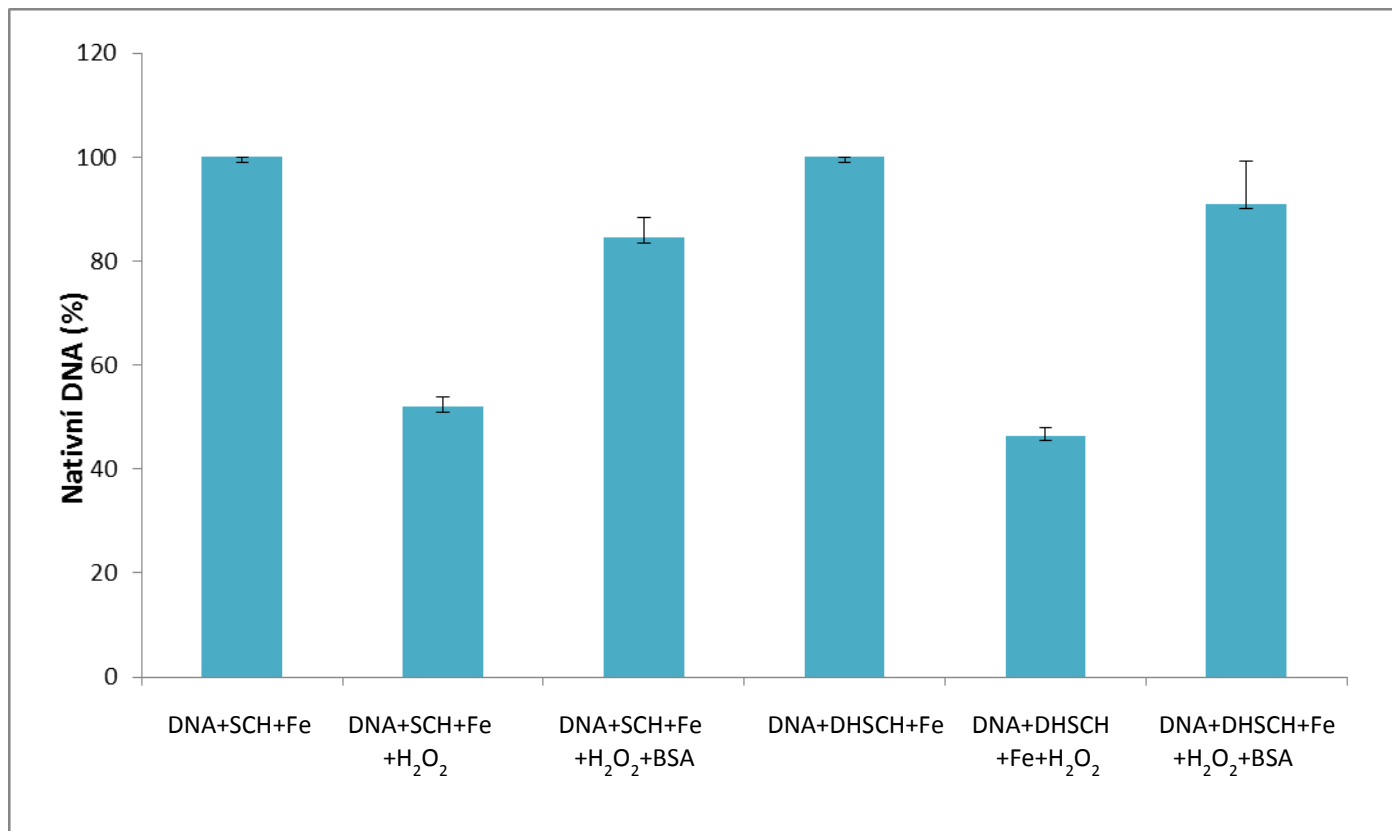
Graf 2 znázorňuje prooxidační efekty komplexů silybinu a 2,3-dehydrosilybinu s kovem. Z grafu (sloupce dva a pět) vyplývá, že komplex silybinu vykazuje v přítomnosti H_2O_2 vyšší prooxidační účinky než komplex 2,3-dehydrosilybinu s Fe. Nižší prooxidační účinky komplexu dehydrosilybinu/Fe mohou souviset s jeho vyšší antioxidační kapacitou popř. nižší rozpustností ve vodném prostředí. Prooxidační účinky komplexu silybinu/Fe na DNA byly vlivem sérového albuminu potlačeny výrazněji než u komplexu dehydrosilybinu/Fe.

Graf 2 – Grafické znázornění elektroforetické detekce DNA po inkubaci s Fe-komplexy silybinu a 2,3-dehydrosilybinu.



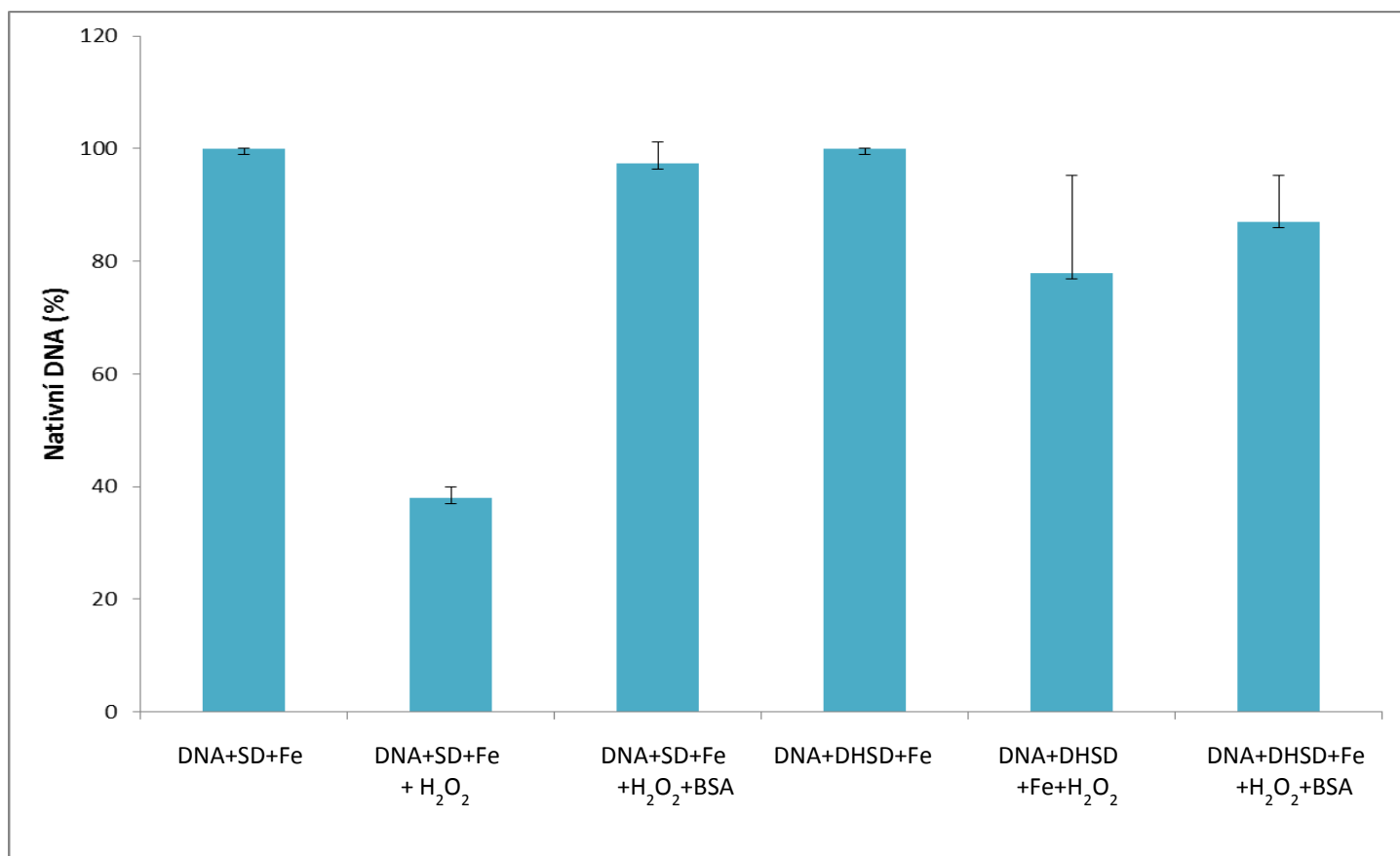
Elektroforetické separace ostatních flavonolignanů jsou vyjádřeny pouze graficky. V grafu 3 lze vidět interakci komplexu silychristinu/Fe a 2,3-dehydrosilychristinu/Fe s DNA. První a čtvrtý sloupec zobrazuje efekt komplexu silychristinu a 2,3-dehydrosilychristinu na DNA. Ze srovnání sloupců dva a pět vyplývá, že silychristin vykazuje v přítomnosti H₂O₂ nepatrně nižší prooxidační účinky na DNA než 2,3-dehydrosilychristin. Protektivní účinky BSA jsou patrnější v případě 2,3-dehydrosilychristinu.

Graf 3 – Grafické znázornění elektroforetické detekce DNA po interakci s komplexy silychristinu/Fe a 2,3-dehydrosilychristinu/Fe.



Graf 4 zobrazuje prooxidační účinky komplexů silydianinu a 2,3-dehydrosilydianinu na DNA. První sloupec zobrazuje interakci komplexu silydianinu/Fe s DNA. Čtvrtý sloupec zobrazuje interakci komplexu 2,3-dehydrosilydianinu/Fe s DNA. Fe-komplex silydianinu má větší poškozující účinky na DNA než Fe-komplex 2,3-dehydrosilydianinu, jak je možné vidět ze srovnání sloupců dva a pět. Nižší prooxidační efekt komplexu 2,3-dehydrosilydianinu/Fe může souviset s jeho vyšší antioxidační kapacitou. Prooxidační účinky komplexu silydianinu/Fe na DNA byly vlivem BSA potlačeny výrazněji než u komplexu 2,3-dehydrosilydianinu/Fe.

Graf 4 – Grafické znázornění elektroforetické detekce DNA po působení komplexů silydianinu/Fe a 2,3-dehydrosilydianinu/Fe.



6. DISKUSE

Pro analýzu oxidace flavonolignanů SB, DHSB, SCH, DHSCH, SD, DHSD byly zkonstruovány elektrody z pyrolytického grafitu. S využitím metody CV a SWV byla zkoumána schopnost podléhat oxidaci u všech flavonolignanů v podmínkách *ex situ* a *in situ* při pH 7,4 a jejich interakce s DNA. Elektrochemická analýza flavonolignanů v podmínkách *ex situ* metodami CV a SWV voltametrie poukazovala na téměř shodně naměřené hodnoty oxidačních potenciálů u všech flavonolignanů. Výsledné oxidační potenciály se lišily v řádu jednotek či desítek mV, což je v souladu s již dříve publikovanými výsledky (Zatloukalová a kol. 2011).

Zatloukalová a kol. provedli v roce 2011 elektrochemickou analýzu silybinu a jeho derivátů (2,3-dehydrosilybin, 7-O-methylsilybin, 20-O-methylsilybin a isosilybin) s využitím stejných voltametrických metod v podmínkách *ex situ*. Výsledky naznačují, že jedním z prvních oxidačních kroků je oxidace hydroxylové skupiny C-20 a to u všech doposud analyzovaných flavonolignanů. V případě 2,3-dehydroderivátů podléhá nejprve oxidaci vždy hydroxylová skupina C-3. Výsledky publikované Zatloukalovou a kol. (2011) jsou v dobrém souladu s výsledky uvedenými v této diplomové práci.

Elektrochemická analýza oxidace všech vyšetřovaných flavonolignanů podporovaná polyakrylamidovou gelovou elektroforézou naznačuje, že 2,3-dehydroderiváty jsou snadněji oxidovány a jsou reaktivnější. 2,3-Dehydroderiváty vykazovaly vyšší antioxidační kapacitu a nižší prooxidační účinky než flavonolignany SB, SCH a SD. Ze všech modelových 2,3-dehydroderivátů vykazoval nejvyšší antioxidační potenciál DHSCH, který se oxidoval při potenciálu kolem +0,3 V. Pro studium interakce flavonolignanů s DNA byly vytvořeny komplexy flavonolignanů s Fe dle modifikované metodiky Zatloukalová a kol. (2011). Poškozující účinky vytvořených komplexů na DNA byly pozorovány v přítomnosti H₂O₂. Zatloukalová a kol. studovali v roce 2011 interakci flavonolignanů SB a DHSB s DNA v přítomnosti Cu²⁺ a H₂O₂. Gharagozloo a kol. provedli v roce 2008 studii prooxidačních účinků komplexu Fe-SB na buněčném modelu *in vitro*. Tyto výsledky pak byly srovnány s účinky léčiva desferrioxaminu, vyznačující se vysokou schopností vázat železo. Výsledky výše uvedené jednoznačně potvrzují, že flavonolignany jsou schopny asociovat s Cu a Fe ionty a po interakci s DNA navozovat její poškození, které je za vhodně zvolených podmínek podobného rozsahu jako samotná Fentonova reakce.

Kvůli nízké biologické dostupnosti byly připraveny různě modifikované flavonolignany, např. konjugáty s kyselinou gallovou, a ty byly zkoumány podobnými experimentálními přístupy jako zde v této diplomové práci. Vacek a kol. v roce 2013 publikovali studii zaměřenou na antioxidační a prooxidační účinek semisynteticky připraveného flavonolignanu 7-O-galloylsilybinu (7-GSB). Pro studium prooxidačních vlastností 7-GSB byl vytvořen komplex s Cu²⁺. Pomocí

elektrochemických metod bylo zjištěno, že 7-GSB vykazuje významně vyšší antioxidační kapacitu než SB.

Uvedené výsledky naznačují, že biologická aktivita flavonolignanů, která je asociovaná s jejich antioxidačním či prooxidačním účinkem může být důležitým parametrem při interpretaci komplexního účinku těchto látek v organismu (Vacek a kol. 2013).

7. ZÁVĚR

Pro studium reaktivity flavonolignanů a jejich interakce s DNA byly zkonstruovány elektrody z pyrolytického grafitu.

Ve vodném prostředí při pH 7,4 byl studován mechanismus oxidace flavonolignanů (SB, DHSB, SCH, DHSCH, SD, DHSD) a jejich interakce s DNA.

Pro elektrochemickou analýzu flavonolignanů byly využity metody CV a SWV, které byly provedeny v podmínkách *ex situ* a *in situ*.

Pro studium interakce flavonolignanů s DNA byly vytvořeny komplexy flavonolignan/Fe (v stechiometrickém poměru 2:1) v prostředí 0,2 M NaCl.

Prooxidační účinky Fe-flavonolignanových komplexů byly studovány v přítomnosti a absenci H₂O₂ pomocí elektrochemických a elektroforetických metod.

Bylo prokázáno, že 2,3-dehydroderiváty (DHSCH, DHSB, DHSD) se oxidují při nižších potenciálech (~300 mV) než-li samotný SB, SD a SCH. Z uvedeného můžeme usuzovat, že 2,3-dehydroderiváty jsou efektivnějšími antioxidanty než parentní látky.

Z elektrochemických analýz flavonolignanů vyplývá, že nejvyšší antioxidační kapacitu při pH 7,4 vykazuje 2,3-dehydrosilychristin ($E_{p1} = 0,330$ V).

Prokazatelné prooxidační účinky vůči DNA a nejnižší schopnost oxidovat se ve vodném prostředí má silybin a silydianin.

Prooxidační efekty lze významně potlačit v přítomnosti albuminu.

Dosažené výsledky mohou být v budoucnosti využity pro další výzkum reaktivity flavonolignanů a jejich interakcí s biopolymery jako jsou DNA, proteiny a lipidy.

8. LITERATURA

Agarwal C., Singh R.P., Dhanalakshmi S., Tyagi A.K., Tecklenburg M., Sclafani R.A., Agarwal R., Silibinin upregulates the expression of cyclin-dependent kinase inhibitors and causes cell cycle arrest and apoptosis in human colon carcinoma HT-29 cells, *Oncogene* 22 (2003) 8271–8282.

Agarwal R., Agarwal C., Ichikawa H., Singh R.P., Agarwal B.B., Anticancer potential of silymarin: from bench to bed side, *Anticancer Res.* 26 (2006) 4457–4498.

Agarwal C., Wadhwa R., Deep G., Biedermann D., Gažák R., Agarwal R., Křen V., Anticancer efficacy of silybin derivatives - A structure activity relationship, *PloS ONE* 8(3) (2013) e60074.

Ahmad P., Jaleel C.A., Salem M.A., Nabi G., Sharma S., Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress, *Crit. Rev. Biotech.* 30 (2010) 161–175.

Barek J., Možnosti inovací v elektroanalytické chemii: Perspektivy elektroanalytických metod, Praha (2006) 3-15.

Cibiček N., Vacek J. a kol., Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně, Skripta (2014) ISBN 978-80-244-3951-8.

Edenharder R., Grünhage D., Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by *tert*-butylhydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102, *Mutation Research* 540 (2003) 1–18.

Gažák R., Svobodová A., Psotová J., Sedmera P., Příkrylová V., Walterová D., Křen V., Oxidised derivatives of silybin and their antiradical and antioxidant activity, *Bioorg. Med. Chem.* 12 (2004) 5677–5687.

Gharagozloo M., Khoshdel Z., Amirghofran Z., The effect of an iron (III) chelator, silybin, on the proliferation and cell cycle of Jurkat cells: a comparison with desferrioxamine, *Eur. J. Pharmacol.* 589 (1–3) (2008) 1–7.

Goyal R.N., Gupta V. K., Chatterjee S., Electrochemical oxidation of 2,3-dideoxyadenosine at pyrolytic graphite electrode, *Electrochimica Acta* 53 (2008) 5354–5360.

Grinberg L.N., Rachmilewitz E.A., Newmark H., Protective effects of rutin against hemoglobin oxidation, *Biochem. Pharmacol.* 48 (1994) 643–649.

Grotenow E., *The science of flavonoids*, Springer, New York (2006) 1–46.

Gutteridge J.M.C., Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence, *Free Radic. Res. Commun.* 19 (1993) 141–1583.

Heim K. E., Tagliaferro A. R., Bobilya D. J., Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, *Rev. Journal Nutri. Biochemistry* 13 (2002) 572-584.

Křen V., Walterová D., Silybin and silymarin – new effects and applications, *Biomed. Papers* 149 (1) (2005) 29–41.

Markušová K., *Elektrochemické metody*, Vysokoškolské učebné texty (2000).

Materska M., Quercetin and its derivatives: Chemical structure and bioactivity – A review, *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 58 (4) (2008) 407-413.

Matsuda T., Ferreri K., Todorov I., Kuroda Y., Smith C.V., Kandeel F., Mullen Y., Silymarin protects pancreatic β cells against cytokine-mediated toxicity: Implication of c-Jun NH₂-terminal kinase and Janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathways, *Endocrinology* 146 (2005) 175–185.

Matsuura H.N., Rau M.R., Fett-Neto A.G., Oxidative stress and production of bioactive monoterpene indole alkaloids: biotechnological implications, *Biotechnol. Lett.* 36 (2014) 191–200.

Perron N.R., Hodges J.N., Jenkins M., Brumaghim J.L., Predicting how polyphenol antioxidants prevent DNA damage by binding to iron, *Inorg. Chem.* 47 (2008) 6153–6161.

Perron N.R., García C.R., Pinzón J.R., Chaur M.N., Brumaghim J.L., Antioxidant and prooxidant effects of polyphenol compounds on copper-mediated DNA damage, *J. Inorg. Biochem.* 105 (2011) 745–753.

Pourcel L., Routaboul J.M., Cheynier V., Lepiniec L., Debeaujon I., Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions, *Trends Plant Sci.* 12(1) (2006) 29-36.

Quideau S., Deffieux D., Casassus C.D., Pouysgu L., Plant Polyphenols: Chemical properties, biological activities and synthesis, *Angew. Chem. Int. Ed.* 50 (2011) 586–621.

Švancara I., Elektroanalýza s uhlíkovými pastovými elektrodami In: Barek J. (ed.): Možnosti inovací v elektroanalytické chemii, Praha (2006) 49-59.

Tan J., Wang B.C., Zhu L.C., DNA binding and oxidative DNA damage induced by quercetin copper (II) complex: potential mechanism of its antitumor properties, *J. Biol. Inorg. Chem.* 14 (2009) 727–739.

Trouillas P., Marsal P., Svobodová A., Vostálová J., Gažák R., Hrbáč J., Sedmera P., Křen V., Lazzaroni R., Duroux J.L., Walterová D., Mechanism of the antioxidant action of silybin and 2,3-dehydrosilybin flavonolignans: a joint experimental and theoretical study, *J. Phys. Chem. A* 112 (2008) 1054–1063.

Vacek J., Masařík M., Paleček E., Fojta M., Elektrochemické metody v analýze nukleových kyselin a bílkovin, *Czech. J. Phys.* 56 (5) (2006) 293-304.

Vacek J., Havran L., Fojta M., Elektrochemická analýza poškození, hybridizace a dalších interakcí DNA, *Chem Listy* 105 (2011) 15-26.

Vacek J., Zatloukalová M., Desmier T., Nezhodová V., Hrbáč J., Kubala M., Křen V., Ulrichová J., Trouillas P., Antioxidant, metal-binding and DNA-damaging properties of flavonolignans: A joint experimental and computational highlight based on 7-O-galloylsilybin, *Chemico-Biological Interactions* 205 (2013) 173–180.

Vychodilová Z., Vývoj elektrochemické metody pro analýzu PCR amplikonů vybraných genomových sekvencí, Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita, Brno (2011).

Wang M.J., Lin W.W., Chen H.L., Chang Y.H., Ou H.C., Kuo J.S., Hong J.S., Jeng K.C.G., Silymarin protects dopaminergic neurons against lipopolysaccharide-induced neurotoxicity by inhibiting microglia activation. *Eur. J. Neurosci.* 16 (2002) 2103–2112.

Yosypchuk B., Pevné amalgamové elektrody a jejich využití v analýze biologicky aktivních sloučenin In: Berek J. (ed.): Možnosti inovací v elektroanalytické chemii, Praha (2006) 15-31.

Zatloukalová M., Křen V., Gažák R., Kubala M., Trouillas P., Vacek J., Ulrichová J., Electrochemical investigation of flavonolignans and study of their interactions with DNA in the presence of Cu(II), *Bioelectrochemistry* 82 (2011) 117–124.

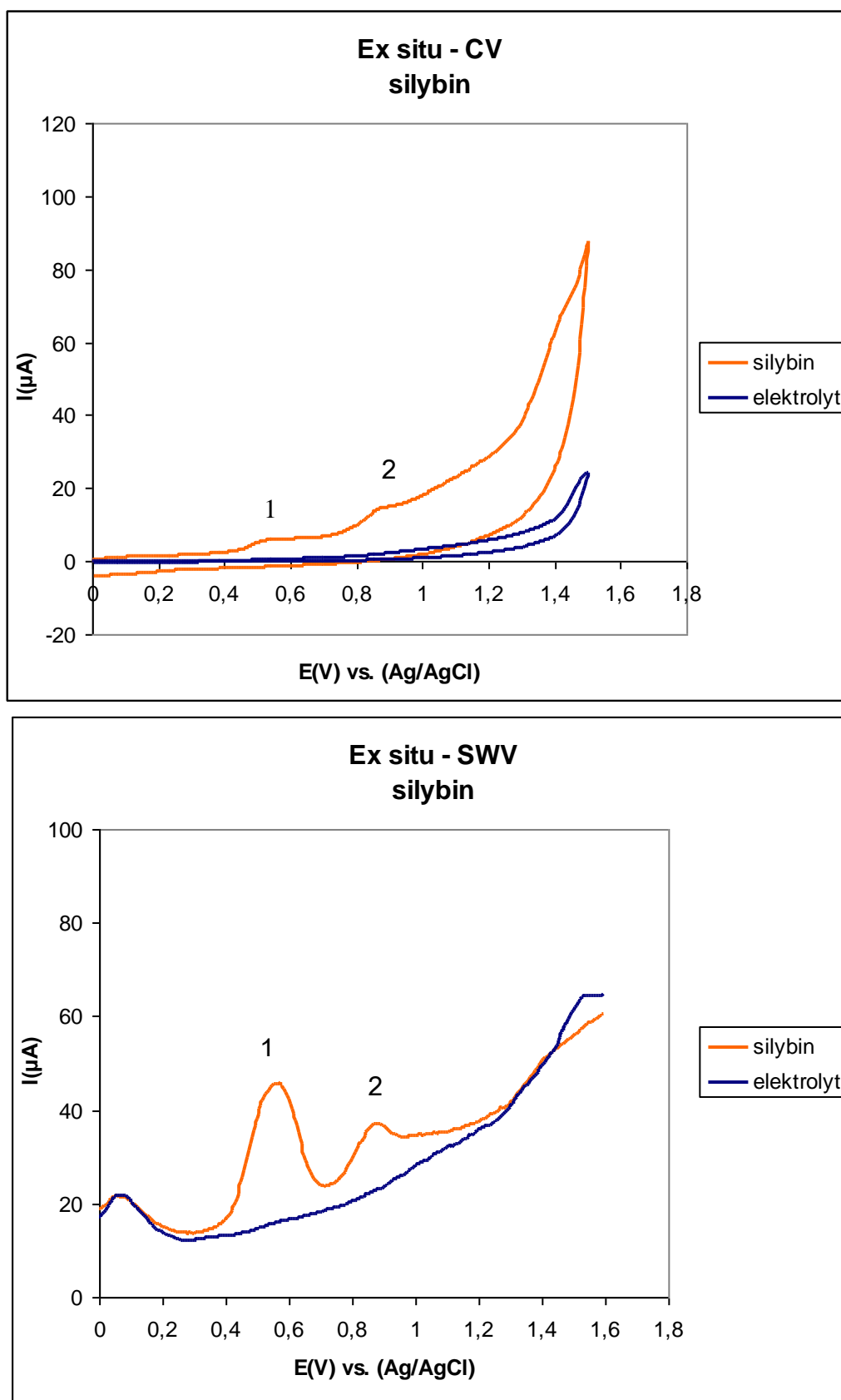
Zhu H. J., Brinda B.J., Chavin K.D., Bernstein H.J., Patrick K.S., Markowitz J.S., An assessment of pharmacokinetics and antioxidant activity of free silymarin flavonolignans in healthy volunteers: A dose escalation study, *Drug. Metab. Dispos.* 41 (2013) 1679–1685.

9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

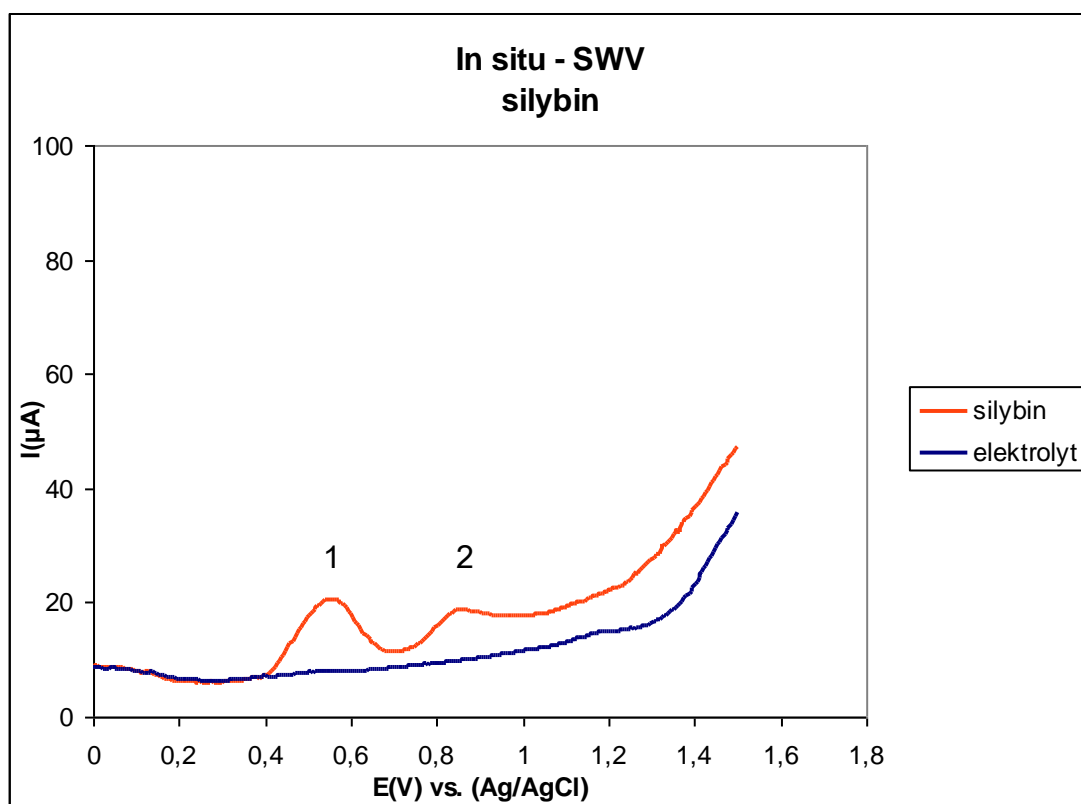
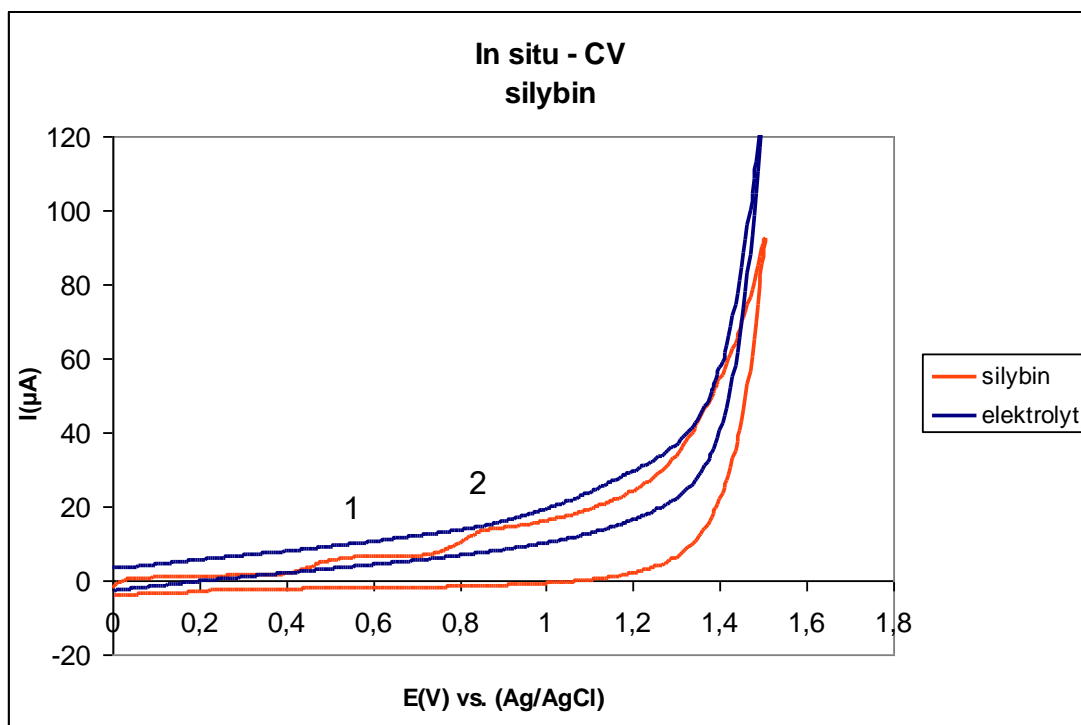
- BR 7,4 = Britton- Robinsonův pufr pH 7,4
BSA = hovězí sérový albumin
CPE = uhlíková pastová elektroda
CV = cyklická voltametrie
CWE = uhlíková vosková elektroda
DHSB = dehydrosilybin
DHSCH = dehydrosilychristin
DHSD = dehydrosilydianin
DNA = deoxyribonukleová kyselina
DME = kapající rtuťová elektroda
DPV = diferenční pulzní voltametrie
EDTA = ethylendiamintetraoctová kyselina
GCE = elektroda ze skelného uhlíku
HMDE = visící rtuťová kapková elektroda
LSV = voltametrie s lineárním skenem
MFE = rtuťová filmová elektroda
ODN = oligonukleotid
PAA = polyakrylamid
PAGE = elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
PGE = elektroda z pyrolytického grafitu
PIGE = parafinem impregnovaná grafitová elektroda
ROS = reaktivní formy kyslíku
RVCE = elektroda ze síťovaného skelného uhlíku
SB = silybin
SCE = nasycená kalomelová elektroda
SCH = silychristin
SD = silydianin
SWV = voltametrie s vkládaným pravoúhlým napětím
TBE = tris-borát-EDTA
TRIS = tris(hydroxymetyl)aminometan

10. PŘÍLOHY

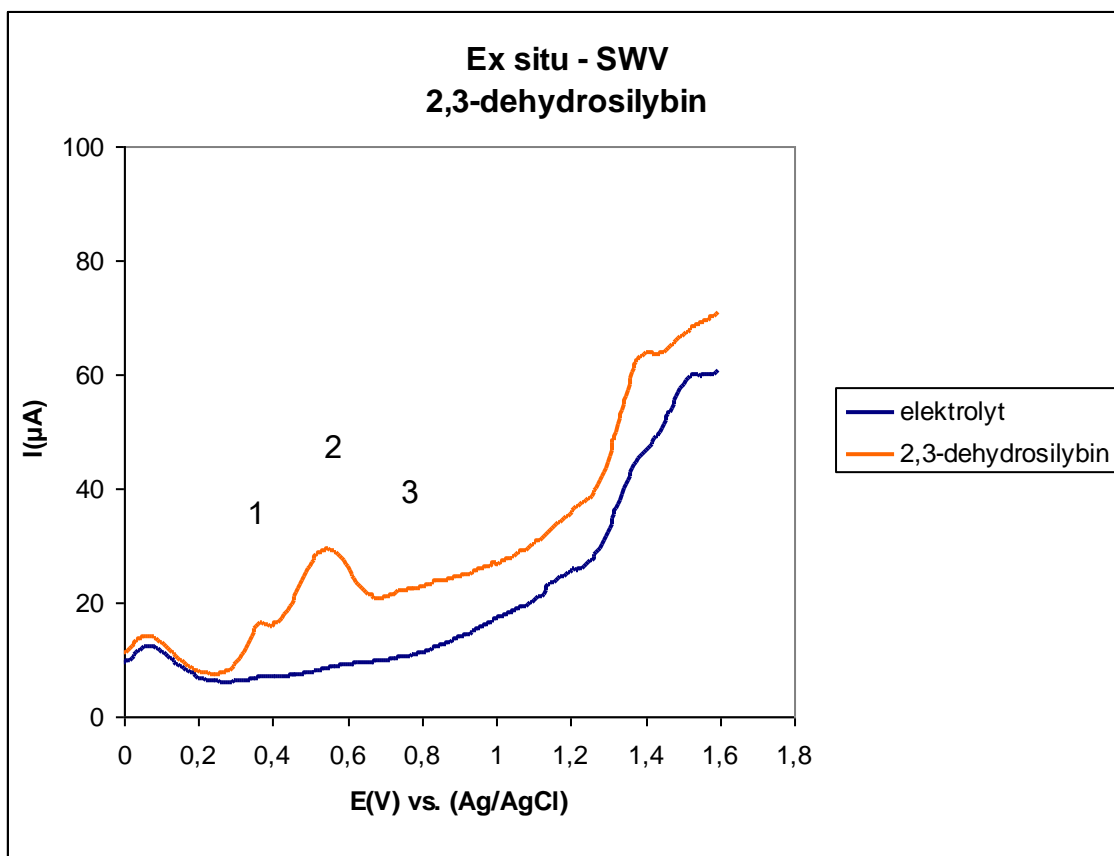
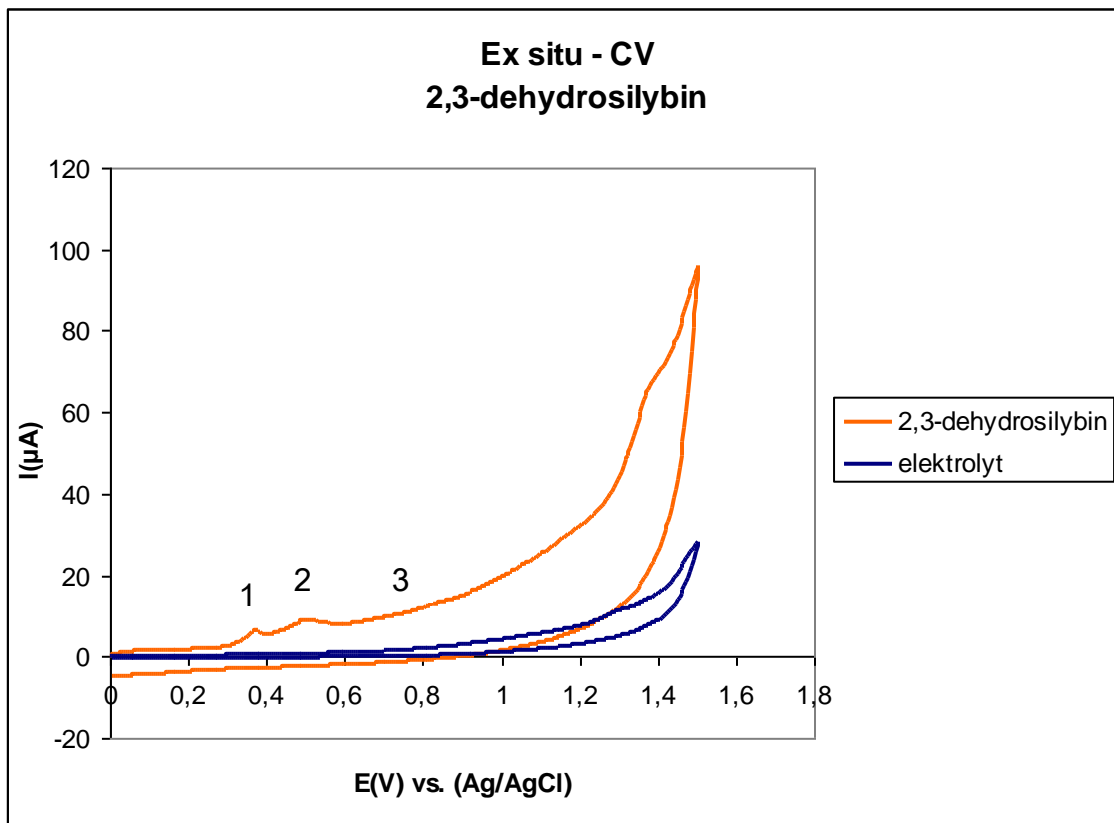
Obr. 14 – CV a SWV voltamogramy silybinu v podmínkách *ex situ* při pH 7,4.



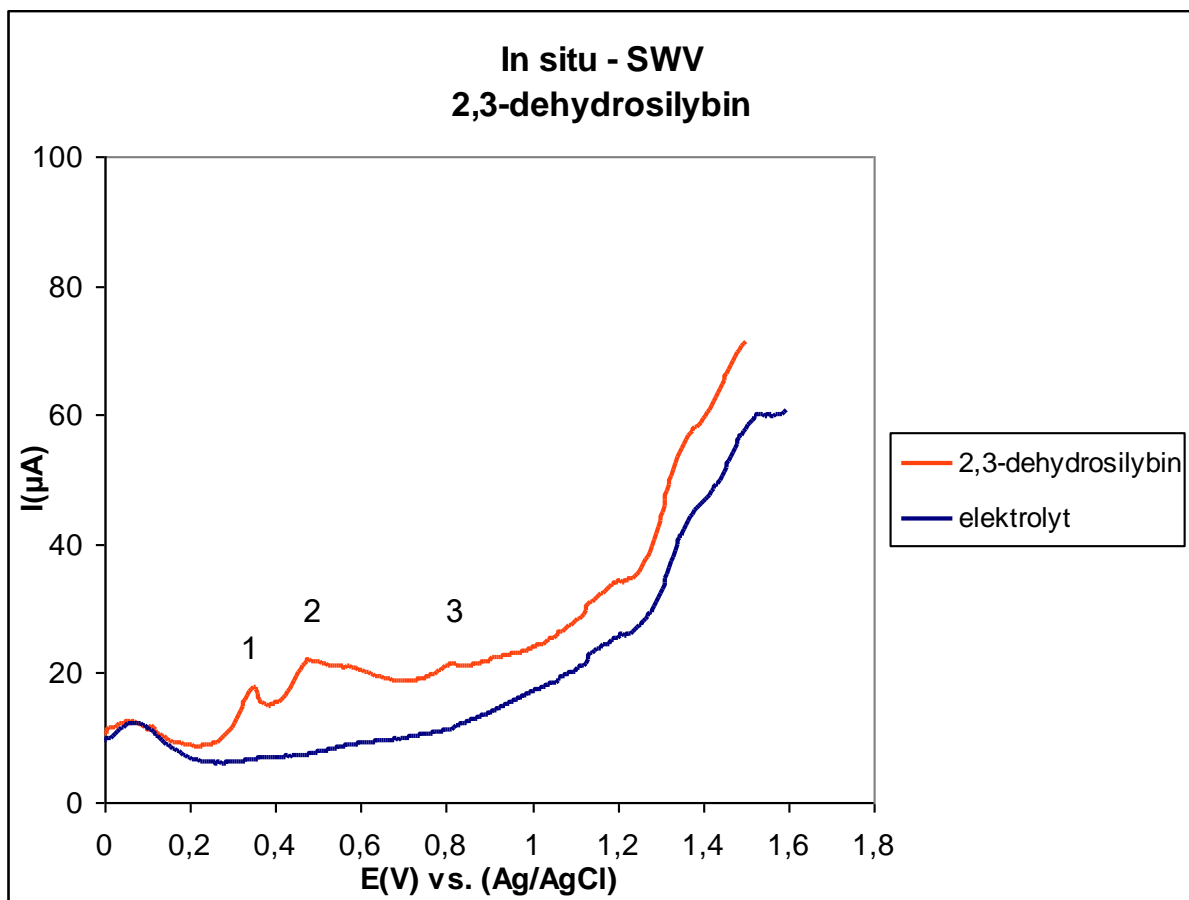
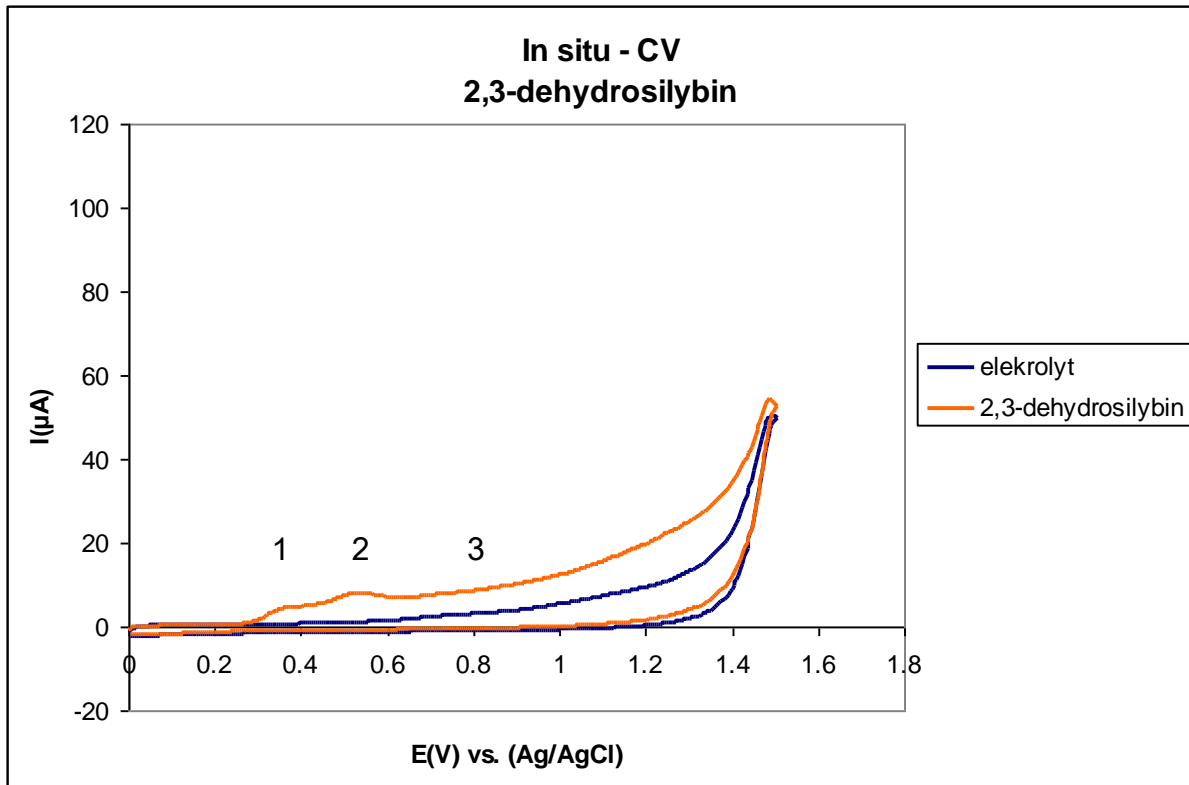
Obr. 15 – CV a SWV voltamogramy silybinu v podmínkách *in situ* při pH 7,4.



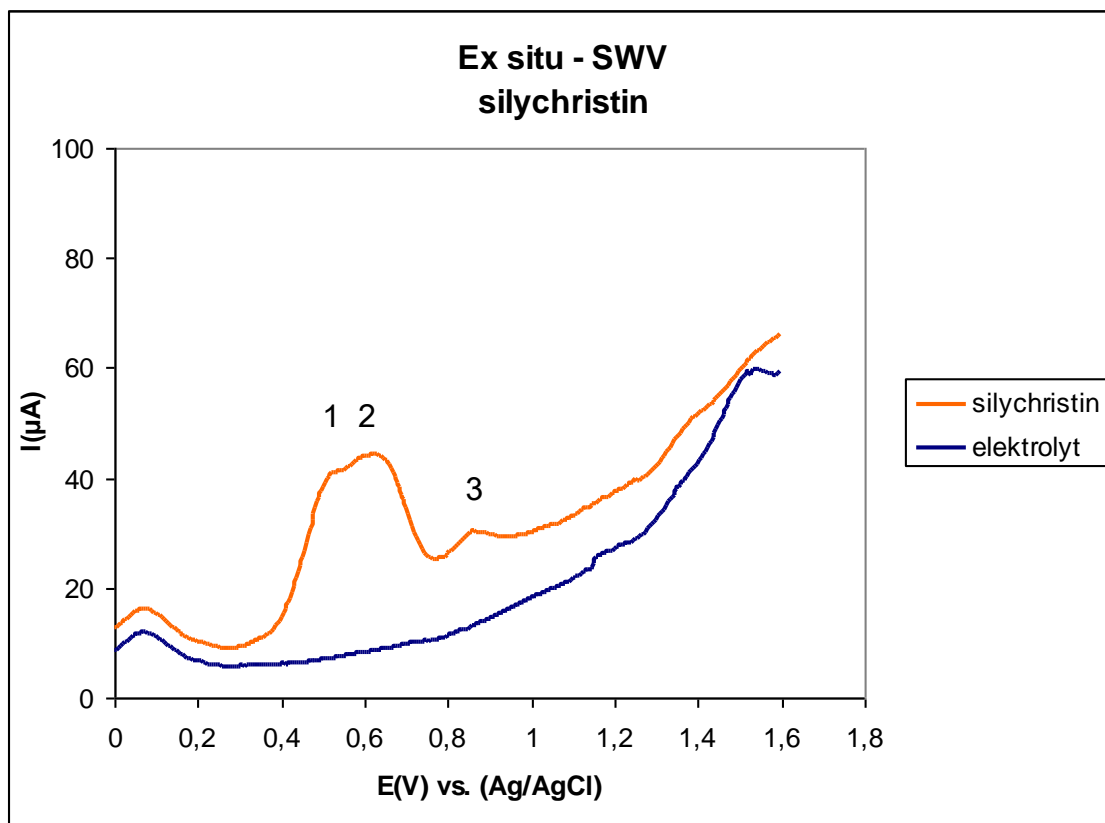
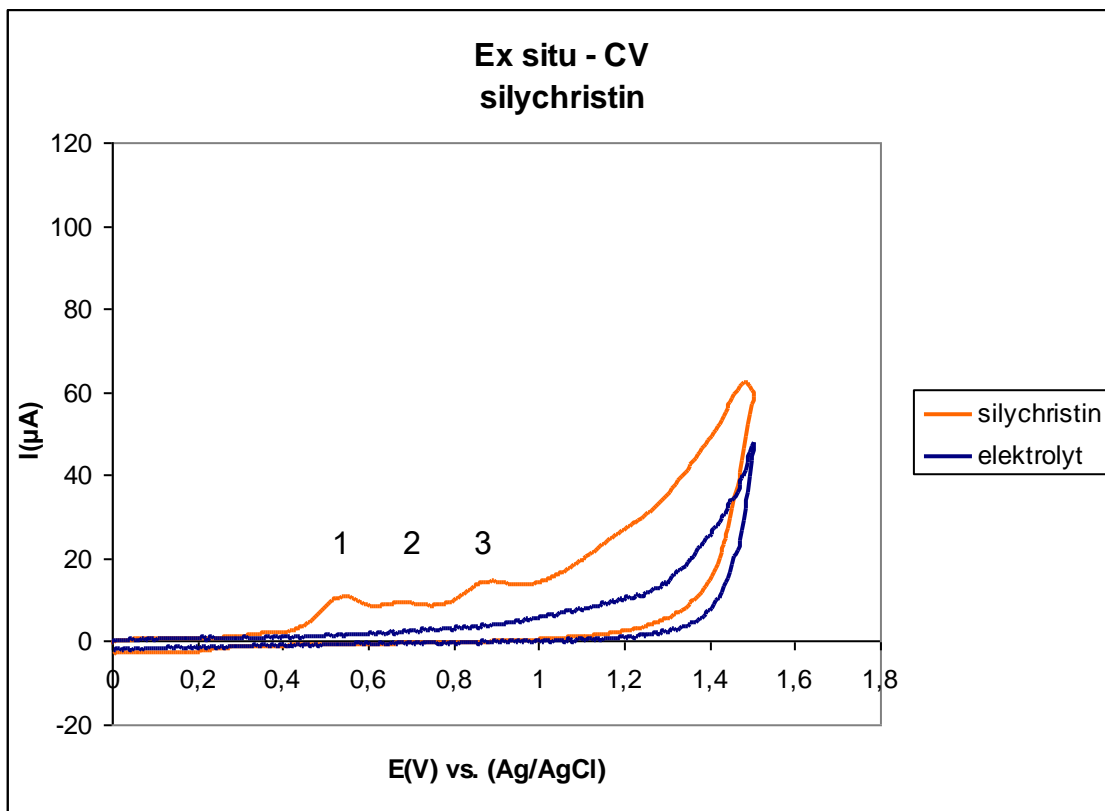
Obr. 16 – CV a SWV voltamogramy 2,3-dehydrosilybinu v podmínkách *ex situ* při pH 7,4.



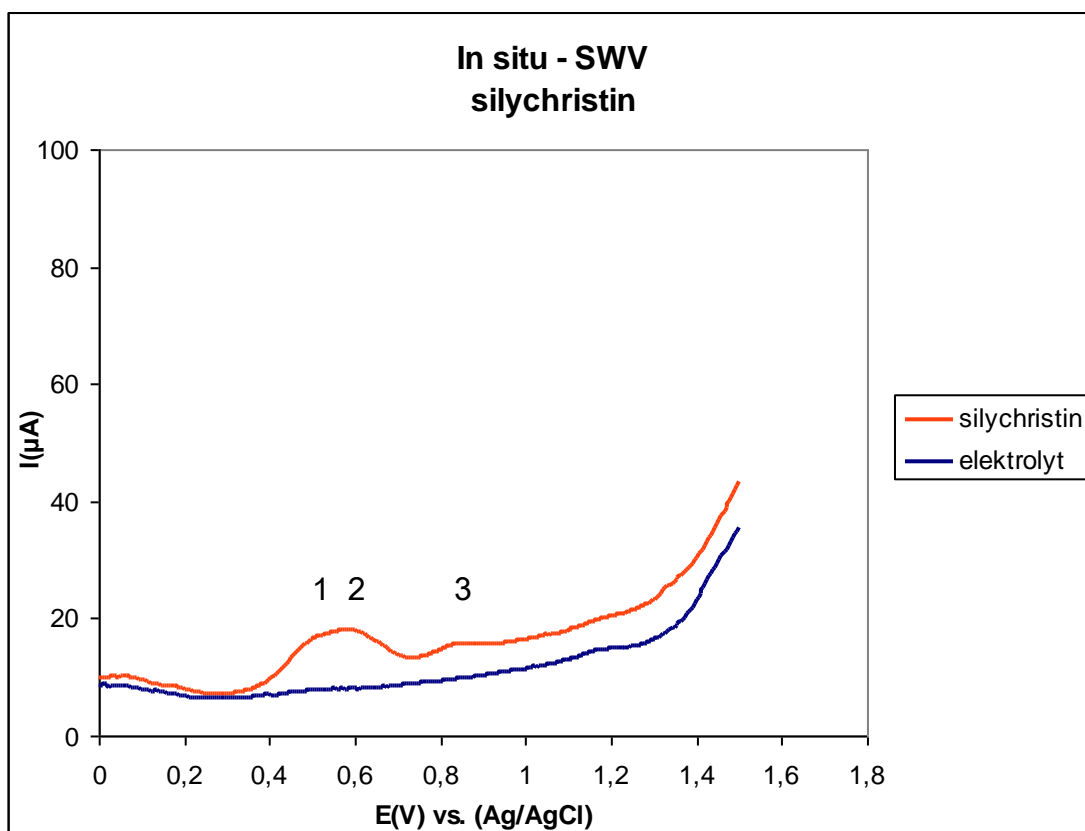
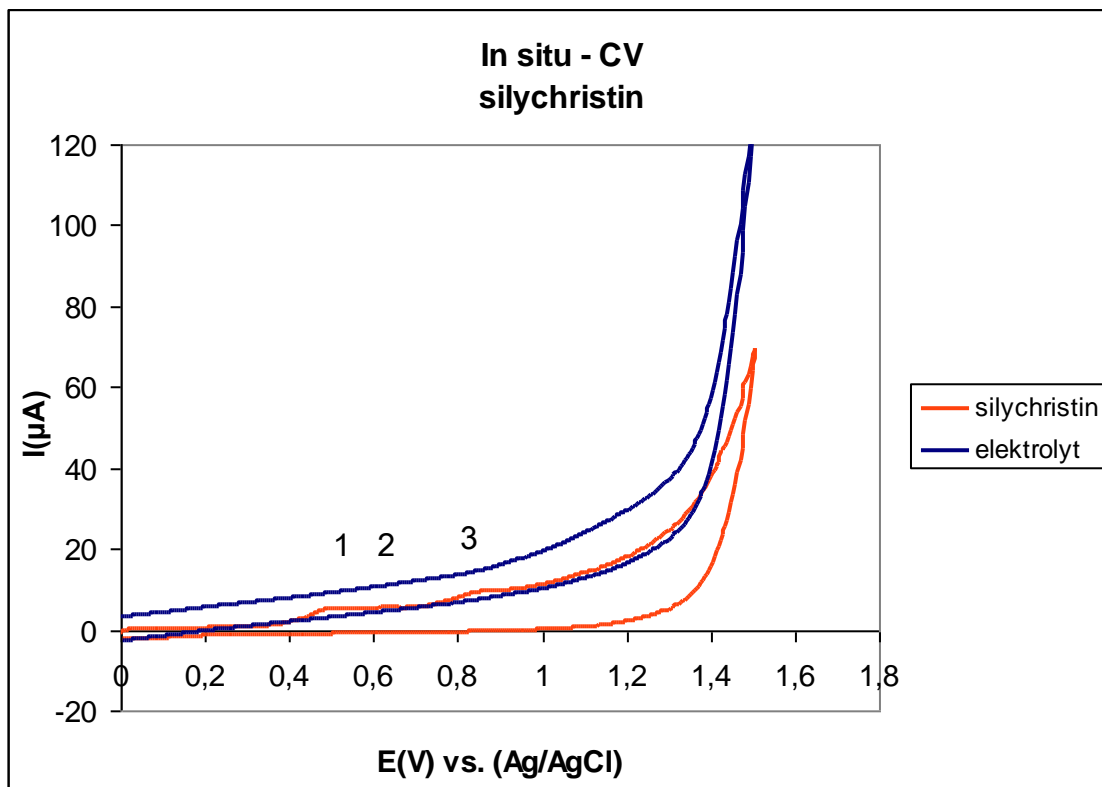
Obr. 17 – CV a SWV voltamogramy 2,3-dehydrosilybinu v podmínkách *in situ* při pH 7,4.



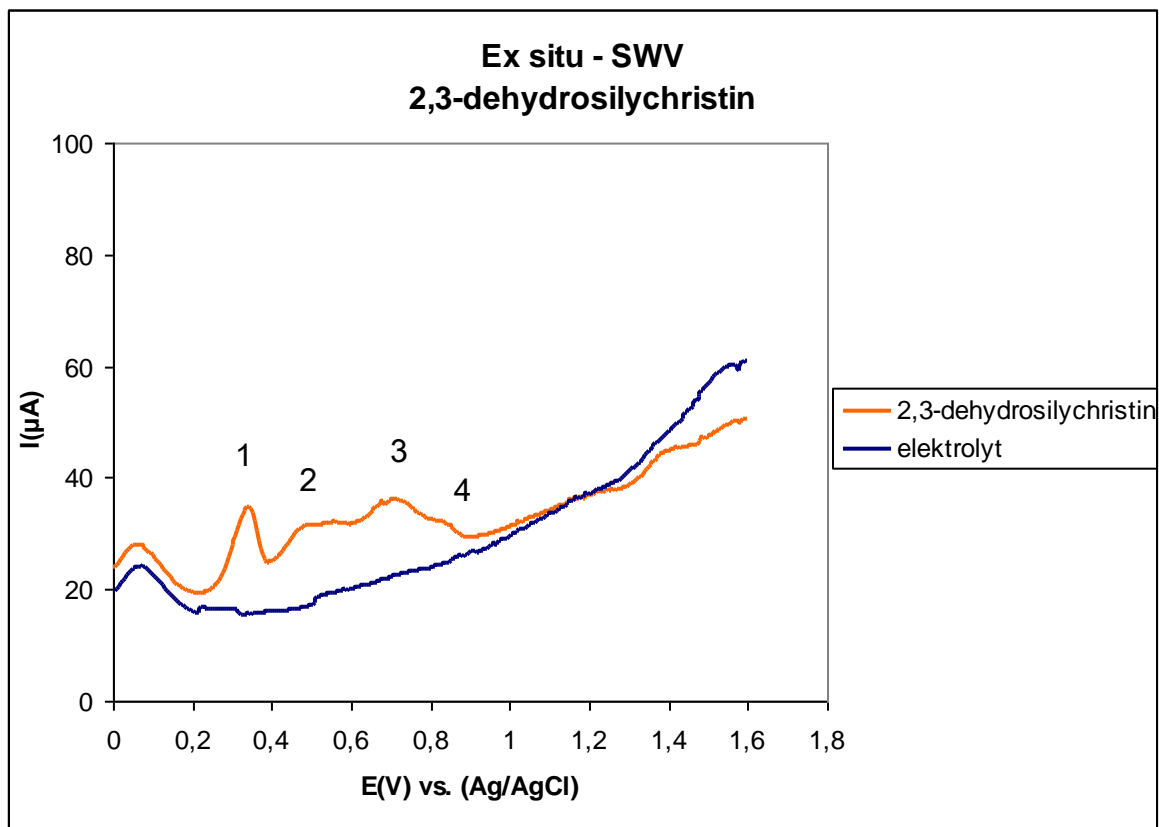
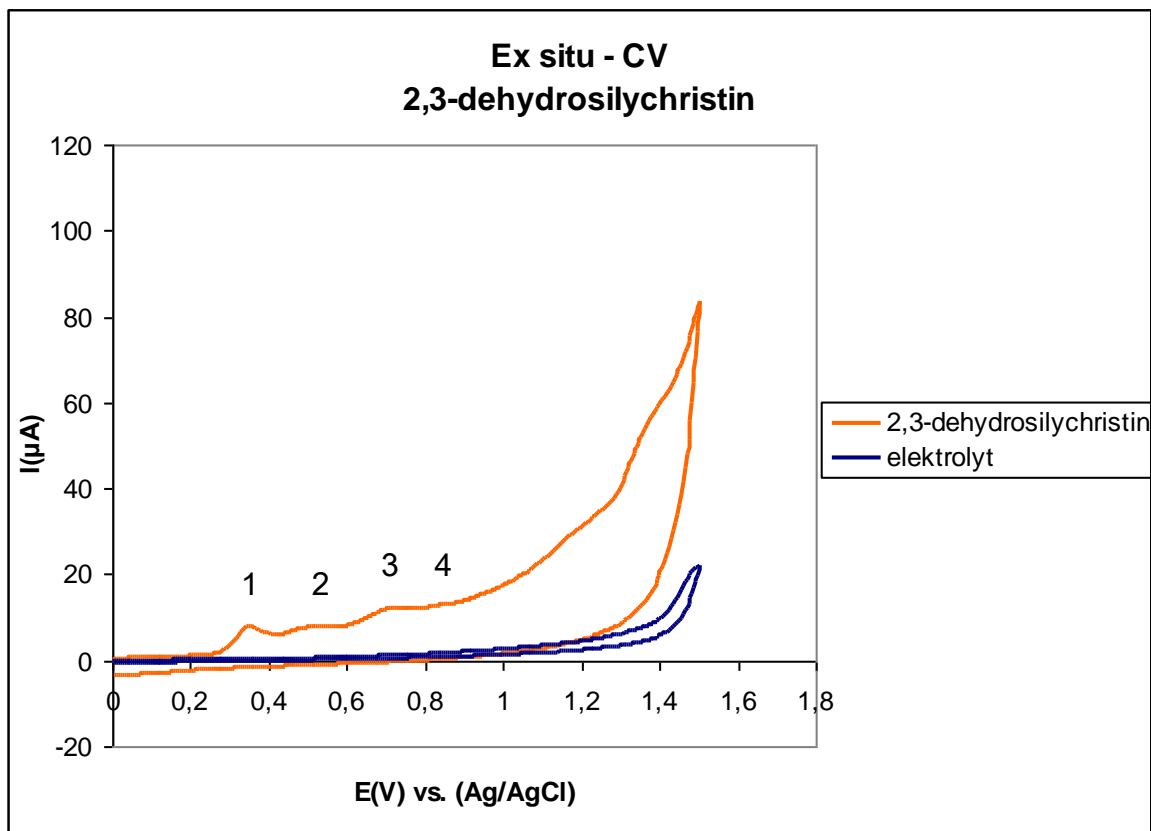
Obr. 18 – CV a SWV voltamogramy silychristinu v podmínkách *ex situ* při pH 7,4.



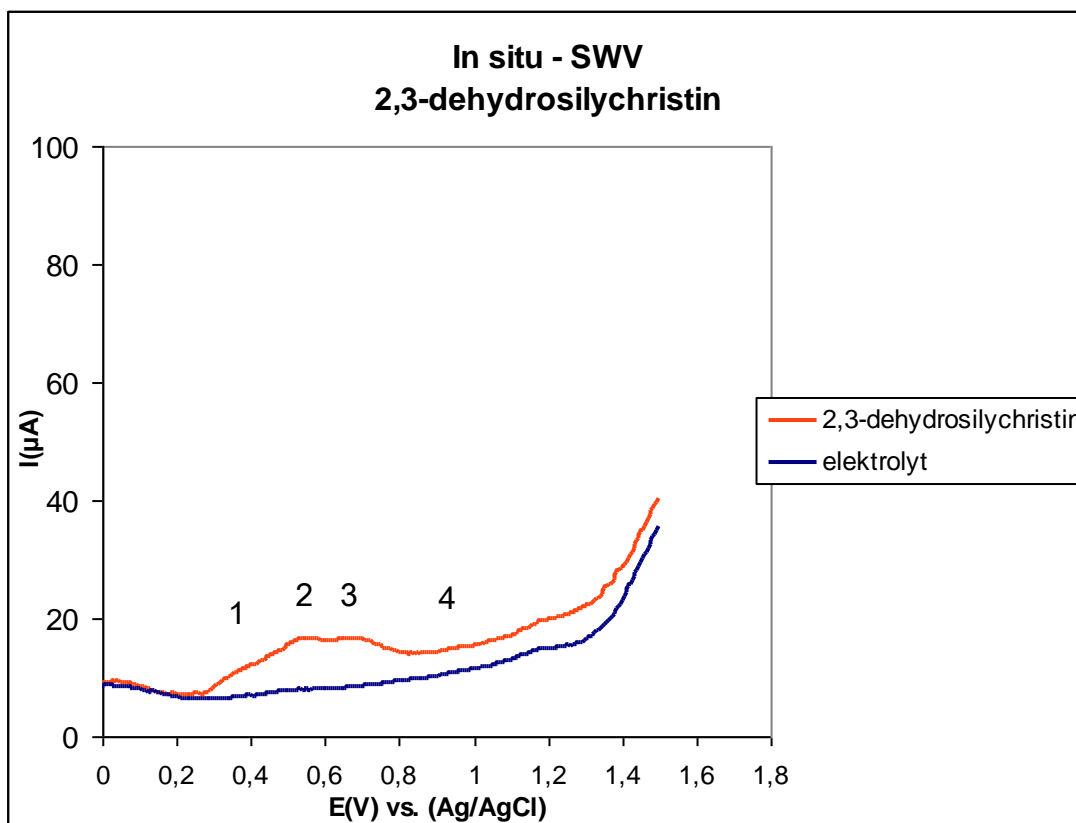
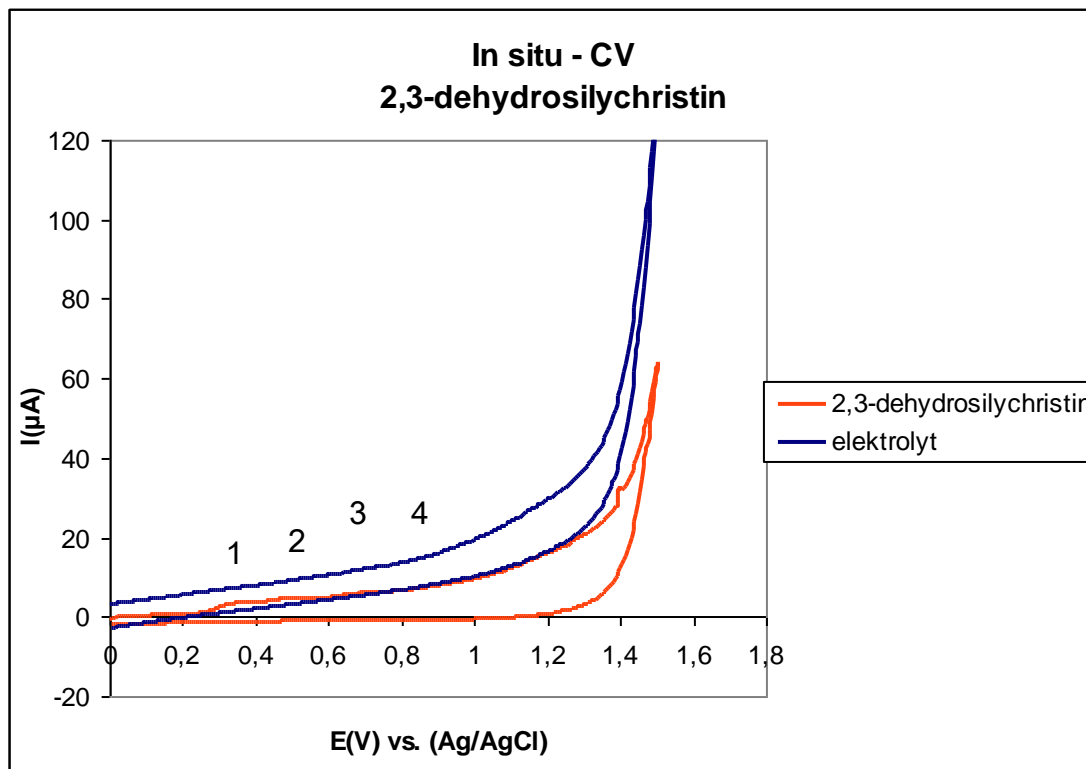
Obr. 19 – CV a SWV voltamogramy silychristinu v podmínkách *in situ* při pH 7,4.



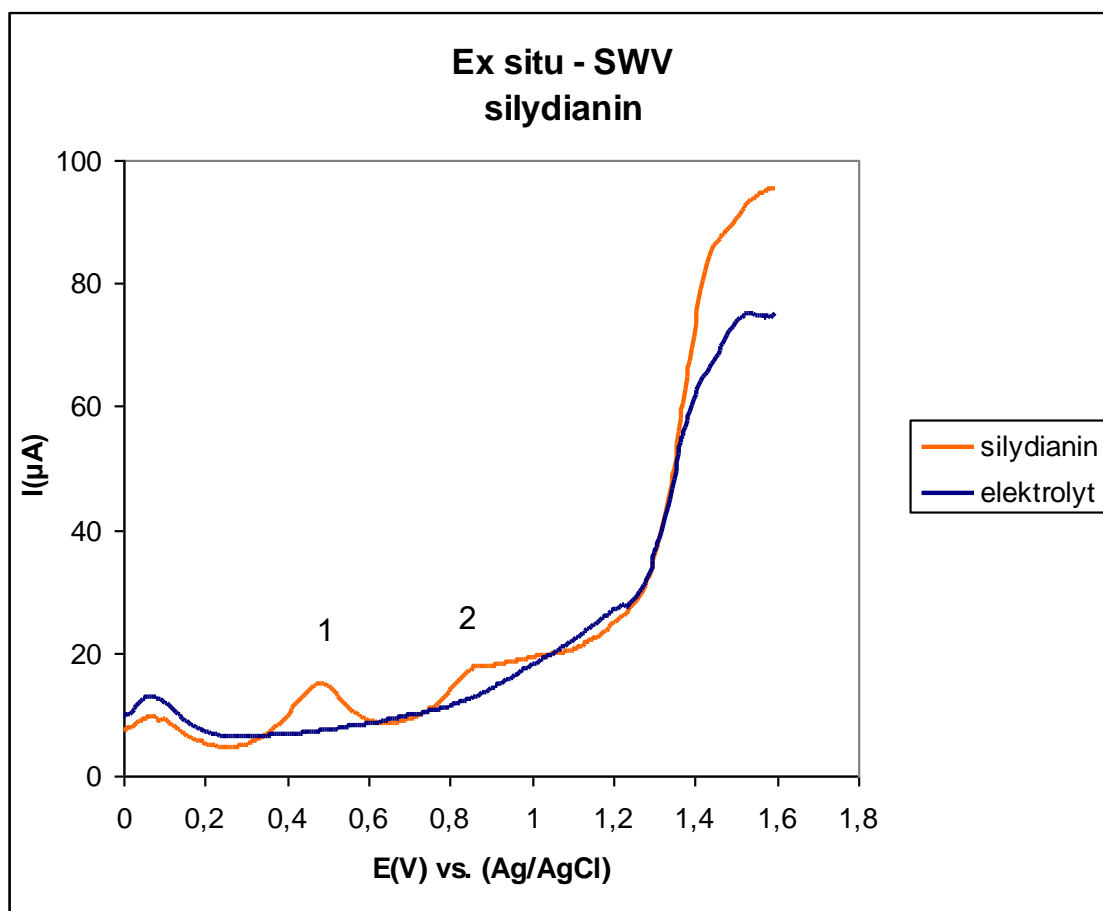
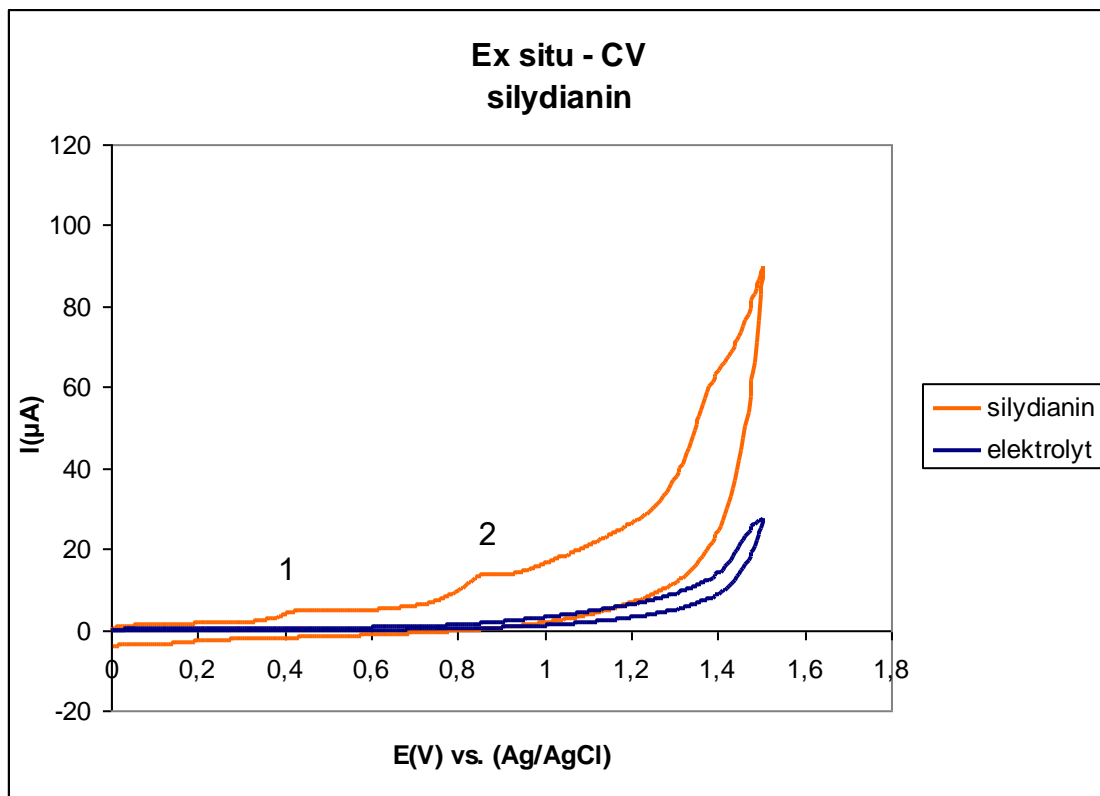
Obr. 20 – CV a SWV voltamogramy 2,3-dehydrosilychristinu v podmínkách *ex situ* při pH 7,4.



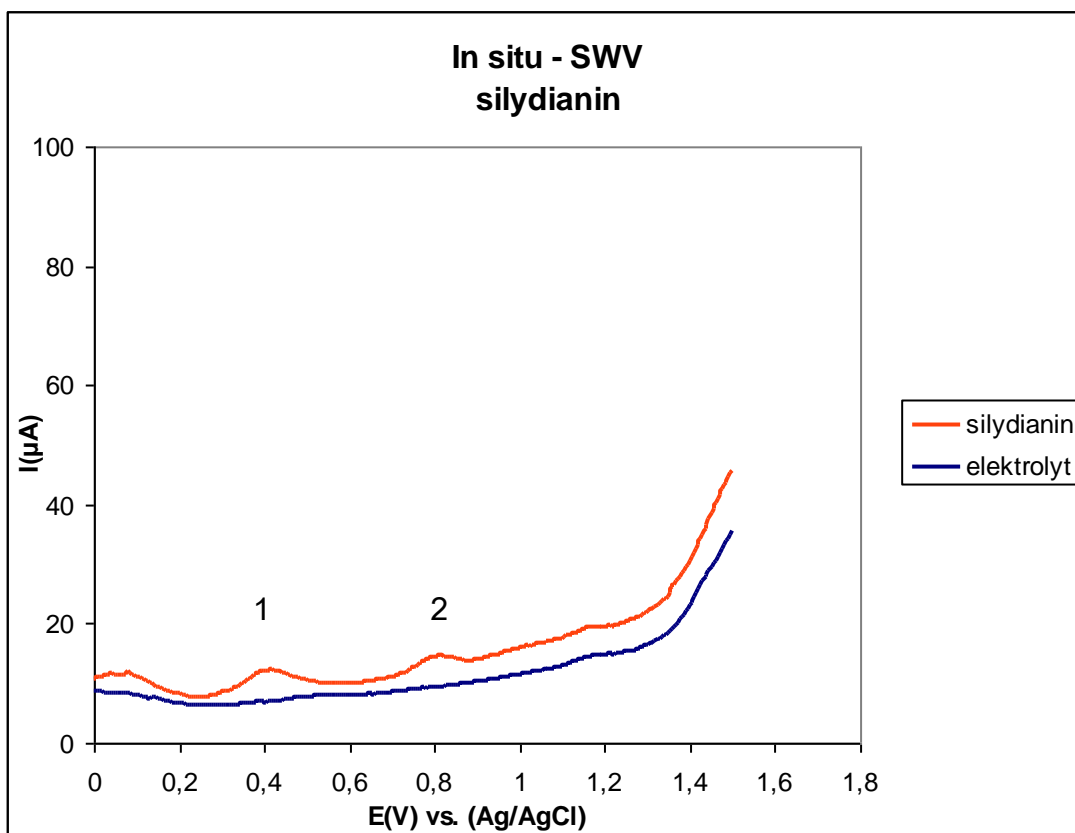
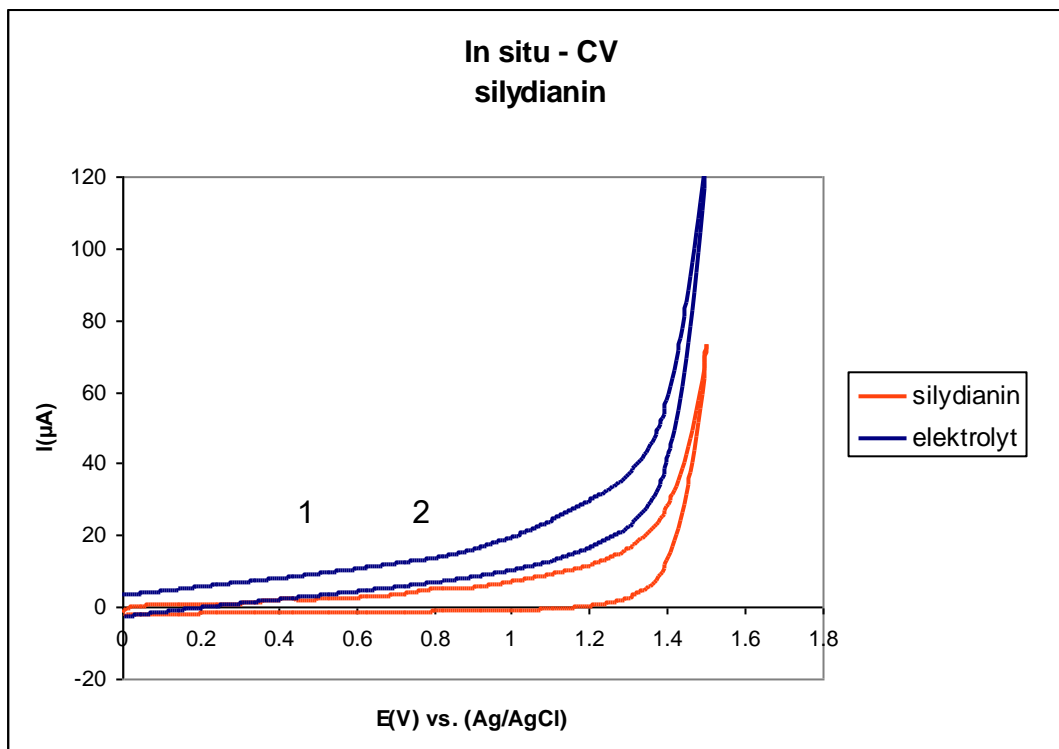
Obr. 21 – CV a SWV voltamogramy 2,3-dehydrosilychristinu v podmínkách *in situ* při pH 7,4.



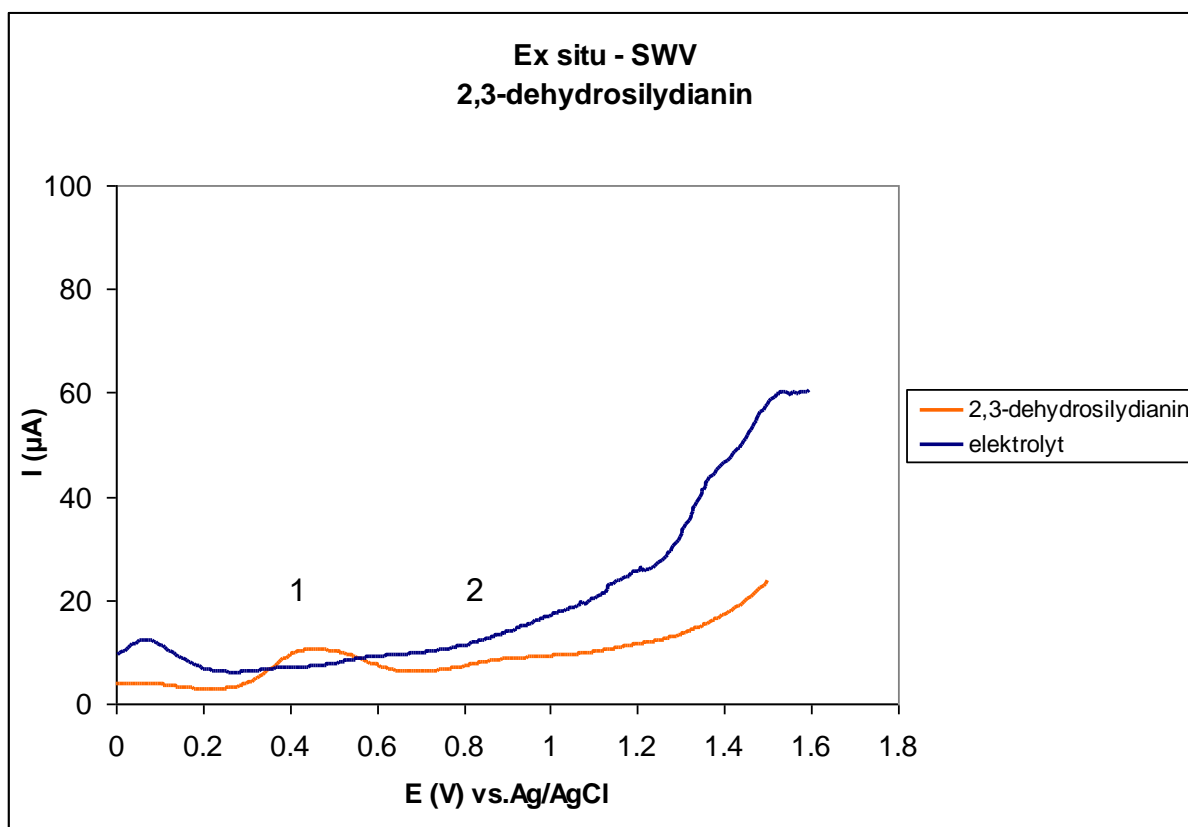
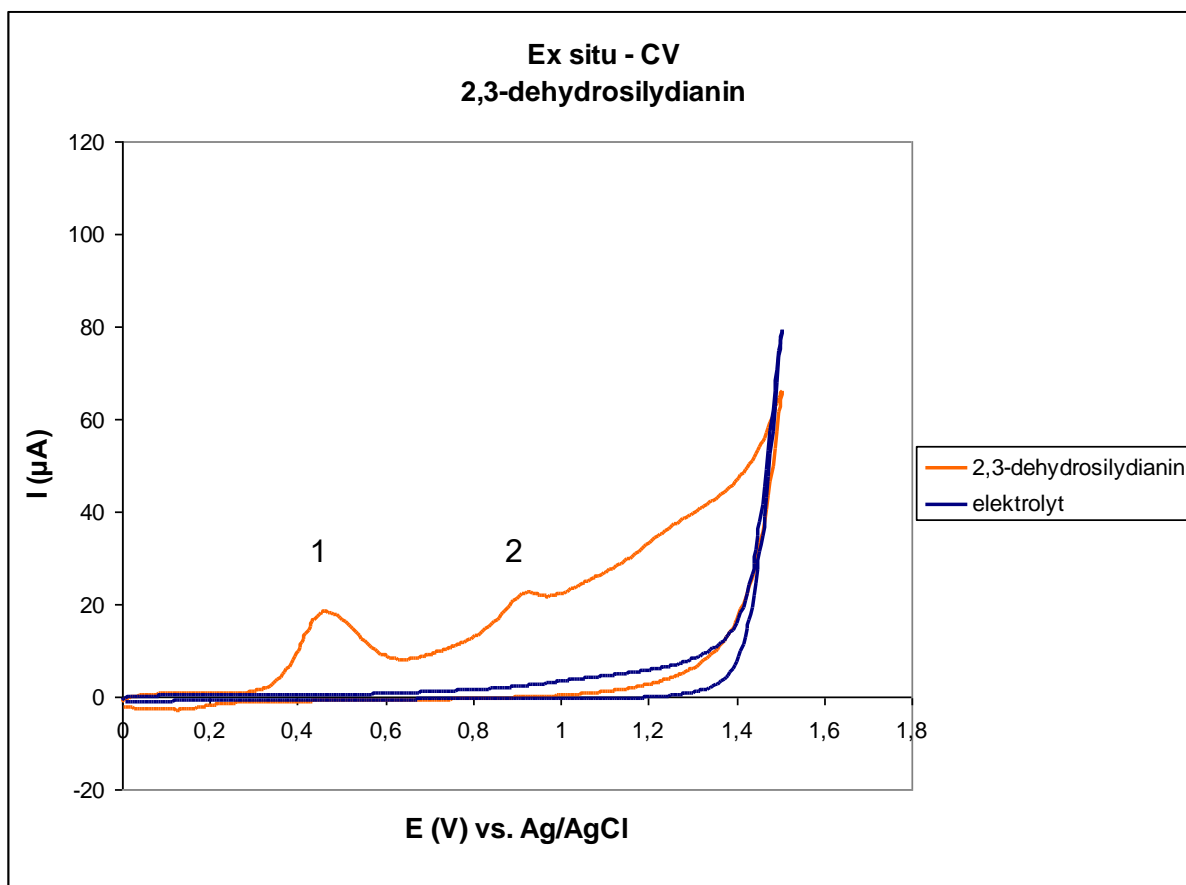
Obr. 22 – CV a SWV voltamogramy silydianinu v podmínkách *ex situ* při pH 7,4.



Obr. 23 – CV a SWV voltamogramy silydianinu v podmínkách *in situ* při pH 7,4.



Obr. 24 – CV a SWV voltamogramy 2,3-dehydrosilydianinu v podmínkách *ex situ* při pH 7,4.



Obr. 25 – CV a SWV voltamogramy 2,3-dehydrosilydianinu v podmínkách *in situ* při pH 7,4.

