

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Katedra biochemických věd

# **INTERAKCE PŘÍRODNÍCH LÁTEK S MOLEKULOU HSA**

Diplomová práce

Anežka Nováková

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Iva Boušová, Ph.D.

Hradec Králové 2009

Děkuji PharmDr. Ivě Boušové, Ph.D. za odborné vedení při vzniku této diplomové práce, za všestrannou pomoc, cenné rady a podněty. Děkuji také Ing. Lucii Trnkové za obětavou pomoc při experimentech i při zpracovávání odborné literatury.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

## **ABSTRAKT**

Vypracovala: Anežka Nováková

Místo vypracování: Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Iva Boušová, Ph.D.

### **Název: Interakce přírodních látek s molekulou HSA**

Předkládaná diplomová práce se zabývá interakcí vybraných přírodních látek (apigenin, naringenin, kaempferol) s molekulou lidského sérového albuminu. V úvodních experimentech jsem pomocí UV-VIS absorpční spektroskopie sledovala stabilitu zadaných antioxidantů za fyziologických podmínek v průběhu času. Následně jsem pomocí stejné metody zjišťovala, jaký vliv má na stabilitu rozdílná teplota uchovávání. Vlastní interakci vybraných antioxidantů s molekulou albuminu jsem sledovala pomocí UV-VIS absorpční spektroskopie a fluorescenční spektroskopie. Fluorimetrická titrace prokázala, že zmíněné antioxidanty zhášejí tryptofanovou fluorescenci v molekule lidského albuminu. Pomocí Stern-Volmerovy analýzy jsem zjistila, že v rozsahu počátečních koncentrací antioxidantů (2,5 - 10  $\mu\text{M}$ ), byl mechanismus zhášení fluorescence statický. Vypočítané vazebné parametry antioxidantů poskytly konkrétnější informace o jejich interakci s albuminem a odhalily vztah mezi jejich chemickou strukturou a afinitou k albuminu. Přítomnost 3-OH skupiny společně s 2,3 nenasyčeným kruhem C (struktura kaempferolu) pravděpodobně vede v rámci vybraných zástupců k nejvyšší afinitě k albuminu.

## **ABSTRACT**

Author: Anežka Nováková

Publishing place: Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Supervisor: PharmDr. Iva Boušová, Ph.D.

### **Title: Interaction of Natural Compounds with the Molecule of HSA**

This diploma thesis is concerned with the interaction of chosen natural compounds (apigenin, naringenin, kaempferol) with the molecule of human serum albumin. In initial experiments, I observed the stability of these antioxidants under physiological conditions in time by UV-VIS absorption spectroscopy. Then I observed an influence of different storage temperatures on the stability using the same method. The proper interaction of chosen antioxidants with albumin was studied by UV-VIS absorption spectroscopy and fluorescence spectroscopy. Fluorimetric titration proved that mentioned antioxidants quenched the tryptophan fluorescence in the molecule of human serum albumin. Using the Stern-Volmer analysis I found out that a mechanism of fluorescence quenching was static for all antioxidants in the range of initial concentrations (2,5 - 10  $\mu\text{M}$ ) of antioxidants. Calculated binding parameters of antioxidants provided more specific information about their interaction with HSA and revealed the relationship between their chemical structure and affinity to HSA. The presence of 3-OH group with 2,3 unsaturated C ring (kaempferol structure) probably leads to the highest HSA affinity among chosen antioxidants.

# OBSAH

1.	ÚVOD .....	2
2.	SOUČASNÝ STAV POZNÁNÍ.....	3
2.1.	Antioxidačně působící sloučeniny .....	3
2.1.1.	Flavonoidy .....	4
2.2.	Lidský sérový albumin .....	10
2.3.	Vybrané metody hodnocení interakce sloučenin s molekulou proteinu .....	13
2.3.1.	Fluorescenční spektroskopie .....	13
2.3.2.	UV-VIS absorpční spektroskopie .....	15
3.	CÍLE PRÁCE.....	18
4.	MATERIÁL A METODIKA .....	19
4.1.	Použitý materiál.....	19
4.2.	Použitá zařízení.....	19
4.3.	Metodika .....	20
4.3.1.	Příprava roztoků .....	20
4.3.2.	Sledování stability vybraných antioxidantů.....	21
4.3.3.	Sledování interakce vybraných antioxidantů s molekulou HSA .....	23
5.	VÝSLEDKY.....	26
5.1.	Sledování stability vybraných antioxidantů.....	26
5.1.1.	Sledování stability vybraných antioxidantů v čase za fyziologických podmínek.....	26
5.1.2.	Sledování stability vybraných antioxidantů při jejich uchovávání při třech různých teplotách .....	30
5.2.	Sledování interakce vybraných antioxidantů s molekulou HSA .....	35
5.2.1.	Sledování interakce antioxidantů s molekulou HSA pomocí UV-VIS absorpční spektroskopie za fyziologických podmínek (37°C, pH 7,4) .....	35
5.2.2.	Sledování interakce antioxidantů s molekulou HSA pomocí fluorescenční spektroskopie (metoda zhasení tryptofanové fluorescence) za fyziologických podmínek (37°C, pH 7,4) .....	43
6.	DISKUZE .....	57
7.	SHRNUTÍ .....	62
8.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	64

## 1. ÚVOD

Tato diplomová práce se zabývá interakcí vybraných přírodních látek (apigenin, naringenin, kaempferol) s molekulou lidského sérového albuminu. Jmenovaní zástupci patří do skupiny flavonoidů, což jsou polyfenolické látky, které se běžně vyskytují v rostlinách jako jejich sekundární metabolity. Pro člověka jsou tyto látky užitečné v souvislosti s jejich antioxidační aktivitou. Oxidační stres hraje významnou negativní roli v procesu stárnutí a vede k rozvoji mnoha patologických stavů (například kardiovaskulární choroby, diabetes mellitus, některé typy rakoviny aj.). Z tohoto důvodu se studium přírodních antioxidačních látek dostalo v posledních letech do popředí vědeckých zájmů.

Zatímco antioxidačnímu účinku flavonoidů v modelu *in vitro* bylo věnováno poměrně dost studií, ohledně jejich působení na živý organismus zůstává stále mnoho nezodpovězených otázek. Potenciální interakce vybraných flavonoidů s molekulou lidského albuminu je velmi důležitým farmakokinetickým parametrem, který by ovlivnil proces distribuce a eliminace, čili i délku trvání a intenzitu jejich účinku v organismu. Efektivní využití flavonoidů jako antioxidačních látek samozřejmě mimo jiné vyžaduje také znalost jejich stability. Na základě stabilitních studií lze určit optimální podmínky uchovávání daných látek nebo produktů, které je obsahují, a posoudit, zda-li vlivem fyziologických podmínek v organismu nedojde k jejich degradaci a zeslabení/ztrátě žádoucího účinku.

V experimentální části své práce jsem se nejdříve věnovala sledování stability antioxidantů za fyziologických podmínek v průběhu času. Následně jsem pozorovala, jaký vliv na stabilitu má teplota uchovávání. Používala jsem UV-VIS absorpční spektroskopii, která je rámcově použitelná zejména pro úvodní stabilitní studie zpravidla s tím, že na ni navazuje některá z přesnějších metod. Vlastní interakci vybraných antioxidantů s lidským albuminem jsem hodnotila v první fázi opět UV-VIS absorpční spektroskopií a následně hlavně fluorescenční spektroskopií, která poskytla bližší informace o vazbě látek na molekulu albuminu.

Zázemí pro praktickou část diplomové práce poskytla katedra biochemických věd FaF UK, kde se již řadu let problematikou antioxidantů zabývá skupina profesora Dršaty a doktorky Boušové.

## 2. SOUČASNÝ STAV POZNÁNÍ

### 2.1. Antioxidačně působící sloučeniny

Podle jedné z definic jsou antioxidanty molekuly, které – jsou-li přítomny v malých koncentracích ve srovnání s látkami, jež by měly chránit – mohou zabraňovat nebo omezovat oxidační destrukci těchto látek (Paulová a kol., 2004). Oxidace je jako přesun elektronů z jednoho atomu na druhý nezbytnou součástí aerobního způsobu života. Pokud ale vzniknou nepárové elektrony - volné radikály, může tento stav způsobovat v organismu problémy.

Mezi reaktivní formy kyslíku a dusíku (RONS) patří zejména superoxid ( $O_2^{\cdot-}$ ), peroxy ( $ROO^{\cdot}$ ), alkoxy ( $RO^{\cdot}$ ), hydroxyl ( $HO^{\cdot}$ ) a oxid dusnatý ( $NO^{\cdot}$ ) (Pietta, 2000). Jsou tvořeny enzymovými i neenzymovými cestami, například při oxidoredukčních reakcích v mitochondriích, v cytochromu P450, účinkem vysokoenergetického záření, činností xanthinoxidasy atd. (Spilková a Dušek, 1996). Tyto radikály negativně působí na biologicky významné sloučeniny, především na lipidy, bílkoviny a nukleové kyseliny, pozměňují jejich strukturu a tím modifikují jejich funkci (Paulová a kol., 2004). Oxidační poškození pravděpodobně hraje zásadní roli při procesu stárnutí a vzniku mnoha degenerativních chorob, jako je například infarkt myokardu, kognitivní dysfunkce a rakovina (Pietta, 2000). Holeček (2006) navíc uvádí volné radikály do souvislosti se stomatologickými nemocemi, chorobami gastrointestinálního traktu, neurologickými a psychiatrickými chorobami, gynekologií, dermatologií, imunologií aj.

Při studiu antioxidačních látek je proto věnována zvláštní pozornost hledání takových látek, jejichž používání by bylo možné při tzv. radikálově podmíněných stavech, a to zejména v prevenci (Spilková a Dušek, 1996).

Lidský organismus je chráněn proti volným radikálům dvěma systémy: antioxidanty, které produkuje tělo (endogenní systém) a antioxidanty, které jsou přijímány jako součást stravy (exogenní systém). První jmenovaný systém zahrnuje enzymové složky (glutathionperoxidasa, katalasa, superoxiddismutasa) i neenzymové složky (glutathion, histidinové peptidy, transferrin a ferritin, melatonin, redukovaný koenzym  $Q_{10}$  a další) (Pietta, 2000). K přírodním látkám s antioxidačními účinky, které jsou přijímány potravou (exogenní systém), jsou v první řadě tradičně řazeny antioxidační vitamíny C, E a karotenoidy.

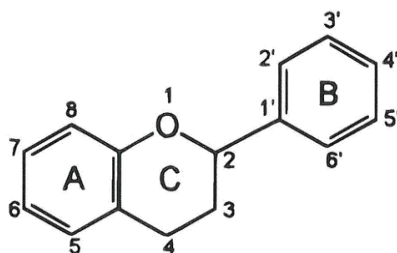
V poslední době se však mnohem větší význam přikládá dalším přírodním látkám, zejména polyfenolickým sloučeninám (Paulová a kol., 2004). Polyfenoly představují širokou paletu sloučenin, které jsou rozděleny do několika skupin: fenolické kyseliny

(hydroxybenzoové kyseliny, hydroxyskořicové kyseliny), **flavonoidy** (antokyaniny, proantokyanidiny, flavonoly, flavony, izoflavony, flavanoly, flavanony), stilbeny a lignany (Švehlová, 2007).

Hlavními zdroji polyfenolů jsou především nápoje (víno, káva, čaj, ovocné džusy), čokoláda a ovoce. Rostlinné polyfenoly, i přesto že představují významnou část antioxidantů přítomných v naší potravě, mohou mít i řadu nepříznivých účinků. Zejména ve vysokých koncentracích mohou působit prooxidačně, mutagenně, genotoxicky či strumigenně. Dlouhodobý efekt a bezpečnost příjmu rostlinných polyfenolů v dávkách, které převyšují obsah v potravinách, není známa (Švehlová, 2007).

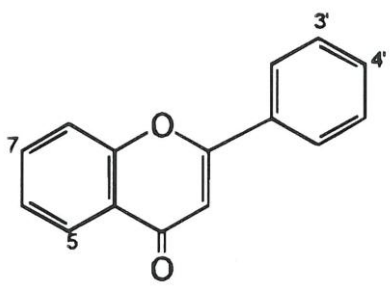
### 2.1.1. Flavonoidy

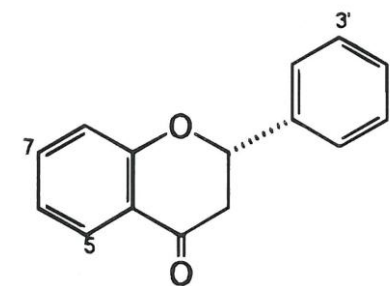
Flavonoidy jsou polyfenolické sloučeniny hojně se vyskytující v rostlinné říši (Yuan a kol., 2007). Vyskytují se převážně jako  $\beta$ -glykosidy, kde cukernou složku tvoří nejčastěji glukosa nebo rhamnosa, méně častá je kyselina glukuronová nebo galaktosa (Švehlová, 2007). V rostlině jsou flavonoidy syntetizovány z aromatických aminokyselin fenylalaninu a tyrosinu a z malonátu. Základem struktury je flavan, který se skládá z 15 uhlíkových atomů. Ty tvoří 3 kruhy, které se označují písmeny A, B, a C (viz obrázek č. 1). Jednotlivé skupiny flavonoidů se od sebe liší stupněm oxidace a substitucí kruhu C (viz tabulka č. 1). V rámci skupiny mohou mít zástupci různé substituenty na kruhu A a B, (Pietta, 2000).

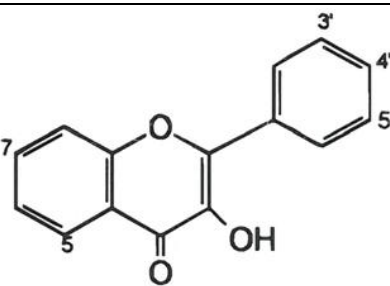


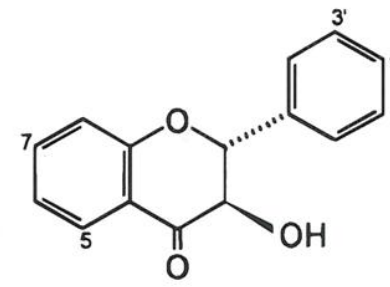
Obrázek č. 1: Flavanové jádro (Pietta, 2000).

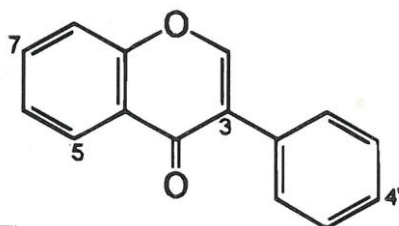
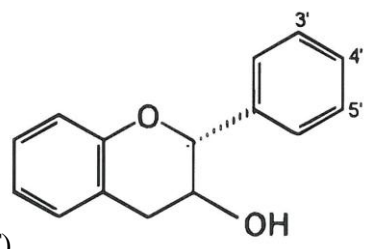
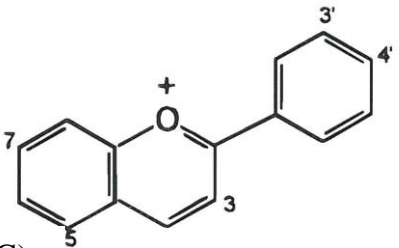
Tabulka č. 1: Skupiny flavonoidů s vybranými zástupci (podle Pietta, 2000).

<div>(A)</div> 	A) FLAVONY	5	7	3'	4'
	<b>apigenin</b>	OH	OH	H	OH
	luteolin	OH	OH	OH	OH
	chrysin	OH	OH	H	H

<div>(B)</div> 	B) FLAVANONY	5	7	3'	4'
	<b>naringenin</b>	OH	OH	H	OH
	hesperetin	OH	OH	OH	OCH <sub>3</sub>

<div>(C)</div> 	C) FLAVONOLY	5	7	3'	4'	5'
	kvercetin	OH	OH	OH	OH	H
	<b>kaempferol</b>	OH	OH	H	OH	H
	myricetin	OH	OH	OH	OH	OH

<div>(D)</div> 	D) FLAVANONOLY	5	7	3'	4'
	taxifolin	OH	OH	OH	OH

 (E)	E) ISOFLAVONY	5	7	4'			
	genistein	OH	OH	OH			
	daidzein	H	OH	OH			
 (F)	(F) FLAVAN-3-OLY	3	5	7	3'	4'	5'
	katechin	$\beta$ -OH	OH	OH	OH	OH	H
	epikatechin	$\alpha$ -OH	OH	OH	OH	OH	H
 (G)	(G) ANTOKYANINY	3	5	7	3'	4'	
	cyanidin	OH	OH	OH	OH	OH	
	cyanin	O-glc	OH	OH	OH	OH	

Tučně jsou zvýrazněny antioxidanty, které byly zvoleny pro experimentální část diplomové práce.

Mezi antioxidační účinností a strukturou flavonoidů byly zjištěny následující závislosti: pro efektivní antioxidační působení je zásadní přítomnost hydroxylových skupin na kruhu B v *o*-poloze a dvojná vazba mezi 2. a 3. uhlíkem v konjugaci s karbonylovou skupinou v poloze 4. Pro maximální účinnost je potřebná dodatečná přítomnost hydroxylových skupin v polohách 3 a 5 (Spilková a Dušek, 1996). Všechny uvedené podmínky splňují zástupci flavonolů kvercetin a myricetin.

Podle Pietta (2000) mechanismy antioxidačního působení flavonoidů zahrnují :

- (1) zabránění vzniku ROS inhibicí enzymů nebo chelatací stopových prvků (kovů), které se podílejí na tvorbě ROS,
- (2) vychytávání ROS,
- (3) podporu nebo ochranu antioxidačního endogenního systému.

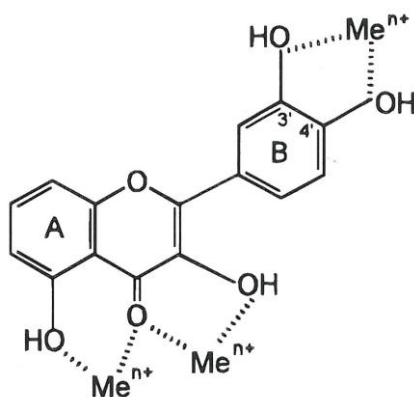
ad (1) Flavonidy inhibují xanthinoxidasu, proteinkinasu, cyklooxygenasu, lipoxygenasu, mikrozomální monooxygenasu, glutathion-S-transferasu, mitochondriální sukcinidasu a NADH-oxidasu. Všechny tyto enzymy hrají roli při vzniku ROS (Pietta, 2000).

Část flavonoidů chelatuje přechodné kovy, které hrají důležitou roli v metabolismu kyslíku. Nevázané železo a měď jsou potenciálními zesilovači vzniku ROS, příkladem je redukce peroxidu vodíku za vzniku hydroxylového radikálu (tzv. Fentonova reakce):



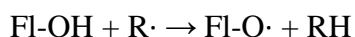
(Pietta, 2000).

Jak je znázorněno na obrázku č. 2, předpokládanými vazebnými místy flavonoidů pro kovy jsou katecholová část kruhu B, 3-hydroxyl a 4-oxo skupina heterocyklu, 4-oxo a 5-hydroxyl skupina mezi heterocyklem a kruhem A (Pietta, 2000).



Obrázek č. 2: Vazebná místa pro kovové prvky (Pietta, 2000).

ad (2) Flavonoidy (Fl-OH) jsou díky nižšímu redoxnímu potenciálu ( $0,23 < E_7 < 0,75$  V) termodynamicky schopné redukovat oxidující volné radikály s redoxním potenciálem v rozmezí 2,13-1,0 V (Pietta, 2000) jako je superoxidový, peroxylový, alkoxylový a hydroxylový radikál (obecně  $\text{R}\cdot$ ), podle následujícího schématu:

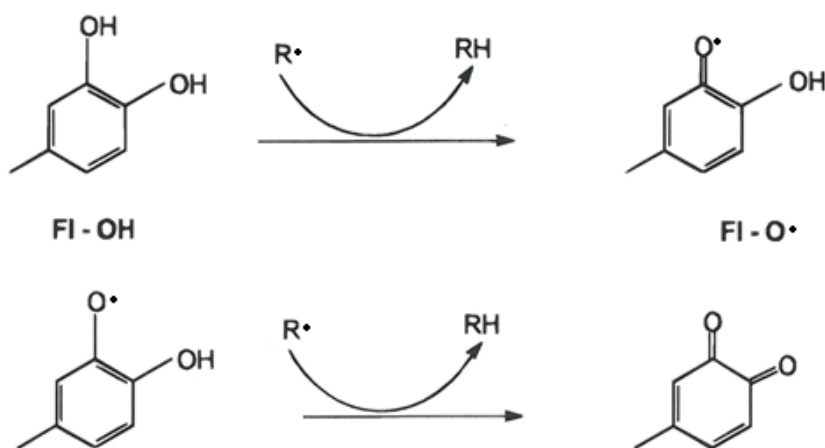


(Pietta, 2000)

Vzniklý aryloxylový radikál FI-O $\cdot$  se může stabilizovat rezonancí v případě, že disponuje 2,3 nenasyceným kruhem C a konjugovanou 4-oxo skupinou. Tato struktura zajistí delokalizaci elektronů z kruhu B (Rice-Evans a kol., 1996). Popřípadě může reagovat s dalším radikálem R $\cdot$  za vzniku stabilní chinonové struktury, pokud obsahuje 2 hydroxy skupiny v *o*-poloze na kruhu B (viz obrázek č. 3).

Pokud nedojde k terminaci aryloxylového radikálu výše uvedenými způsoby, může tento radikál reagovat s kyslíkem za vzniku chinonu a superoxidového radikálu. V tom spočívá možný nežádoucí prooxidační efekt flavonoidů (Pietta, 2000).

Kromě výše uvedeného donorového mechanismu mohou flavonoidy také stabilizovat volné radikály tím, že s nimi vytvoří komplex (Pietta, 2000).



Obrázek č. 3: Schéma redukce ROS (R $\cdot$ ) flavonoidy a vznik chinonu při reakci FI-O $\cdot$  s dalším radikálem (Pietta, 2000).

Příjem flavonoidů v potravě může být mezi 50 až 800 mg za den, v závislosti na množství konzumované zeleniny a ovoce, nebo nápojů jako je červené víno, čaj, či nefiltrované pivo. Dalšími zdroji flavonoidů jsou některé léčivé rostliny (Pietta 2000).

Tabulka č. 2: Přírodní zdroje některých flavonoidů (Rice-Evans a kol., 1996).

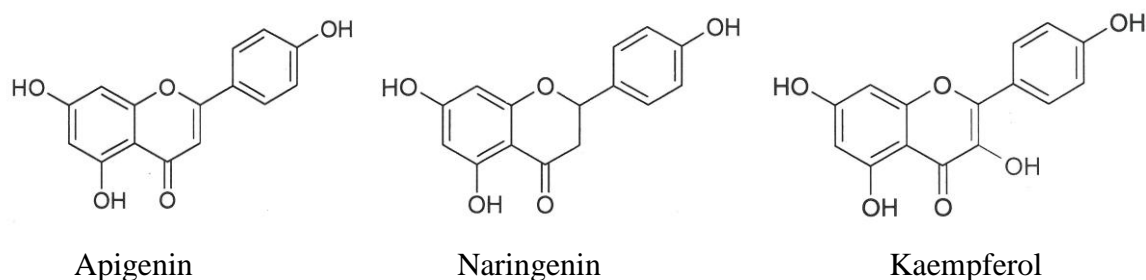
skupina flavonoidů	příklady zástupců	zdroje
flavanoly	epikatechin katechin	zelený čaj, červené víno
flavanony	<b>naringenin</b> taxifolin	kůra citrusových plodů citrusové plody
flavonoly	<b>kaempferol</b>	brokolice, čekanka, pórek, grep, ředkev
	kvercetin	cibule, brokolice, hlávkový salát, jablko, olivy, čaj, červené víno
flavony	<b>apigenin</b> krysin	celer, petržel ovoce
anthokyaniny	malvidin cyanidin	červený grep, červené víno rajče, jahoda, malina, grep

Tučně jsou zvýrazněny antioxidanty, které byly zvoleny pro experimentální část diplomové práce.

Hlavním místem resorpce flavonoidů v trávicím traktu je tenké střevo. Přestože se některé flavonoidy resorbují z trávicího traktu ve formě glykosidů, odštěpení polární složky je nezbytné pro prostou difúzi většiny polyfenolů přes kartáčový lem buněk tenkého střeva. Po resorpci jsou flavonoidy konjugovány s kyselinou glukuronovou, sírovou nebo glycinem. Z organismu jsou vylučovány převážně ve formě polárních ve vodě dobře rozpustných konjugátů močí a žlučí (Švehlová, 2007).

Epidemiologické studie ukazují, že rostlinná potrava chrání organismus před degenerativními onemocněními jako je například rakovina a nemoci kardiovaskulárního systému (Švehlová, 2007). Pouze jedna studie ale prokázala přímý protektivní účinek flavonoidů proti rakovině plic. V současné době neexistuje žádný důkaz o tom, že by příjem flavonoidů chránil proti některým typům rakoviny (Pietta, 2000).

### Flavonoidy vybrané pro experimentální část:



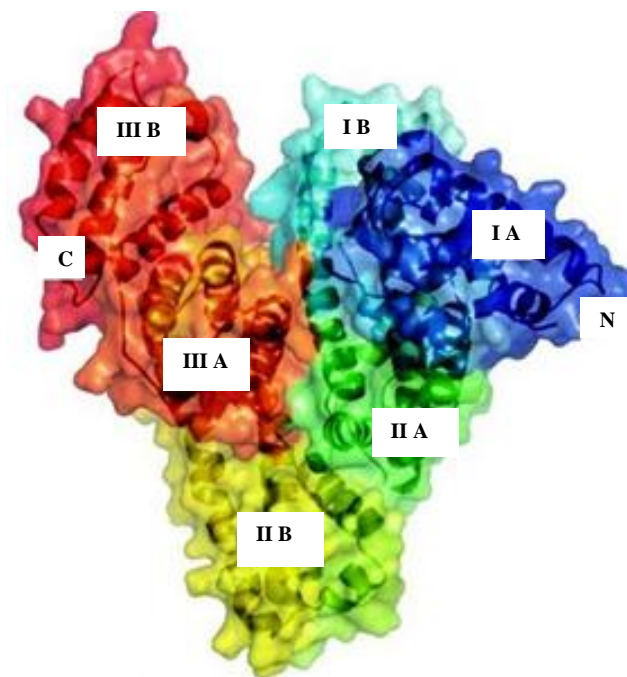
Obrázek č. 4: Struktura vybraných flavonoidů

Ani jeden z vybraných flavonoidů nemá na kruhu B v *o*-poloze dvě hydroxylové skupiny, které jsou společně s dalšími strukturálními předpoklady ideální pro antioxidační působení. Monofenolický kruh B není tak efektivním donorem vodíku jako difenolický. Naringenin navíc oproti zbývajícím dvěma antioxidantům nemá ani 2,3 nenasycený kruh C, který by společně s konjugovanou 4-oxo skupinou zajistil delokalizaci elektronů při stabilizaci aryloxylového radikálu rezonancí. Kaempferol se od apigeninu liší přítomností OH skupiny v poloze 3 na kruhu C, což přispívá ke zvýšení jeho antioxidační aktivity (Rice-Evans a kol., 1996).

## 2.2. Lidský sérový albumin

Lidský sérový albumin (HSA, human serum albumin) je nejhojněji zastoupený protein krevního séra, ve kterém dosahuje koncentrace až 0,63 mM. Analýza krystalové struktury prokázala, že HSA je globulární protein, který se skládá z jediného polypeptidového řetězce z 585 aminokyselin. Obsahuje 17 disulfidických můstků, jeden volný thiol (Cys-34) a jeden tryptofan (Trp-214) (Zhang a kol., 2008).

Peptidový řetězec tvoří pouze  $\alpha$ -helixy,  $\beta$ -skládaný list nebyl ve struktuře HSA nalezen (Otagiri, 2005). Molekulární hmotnost této bílkoviny je 66 kDa a má asymetrický tvar podobný tvaru srdce. Molekula je tvořena třemi homologními doménami (I-III), z nichž každá má dvě subdomény (A a B) (viz obrázek č. 4). Subdoména A se skládá ze skupiny čtyř  $\alpha$ -helixů, které jsou lemovány dalšími dvěma  $\alpha$ -helixy, zatímco subdoména B je tvořena pouze skupinou čtyř  $\alpha$ -helixů (Artali a kol., 2008).



Obrázek č. 5: Struktura HSA (N a C označují N a C konce proteinového řetězce) (Artali a kol., 2008).

Molekula HSA je schopna vázat některé relativně nerozpustné endogenní sloučeniny jako jsou například mastné kyseliny, bilirubin nebo žlučové kyseliny a tím usnadnit jejich transport v krevním řečišti. Také mnoho léčivých látek a xenobiotik se reverzibilně váže na HSA (Zhang a kol., 2008). Léčivé látky tudíž mohou být transportovány krví buď volné (ve vodné fázi plasmy), nebo vázané ve formě komplexu s krevní bílkovinou (např. HSA) (Otagiri, 2005). Vazba léčivé látky na plasmatické proteiny je důležitým farmakologickým parametrem, protože ovlivňuje proces distribuce a eliminace, čili i délku trvání a intenzitu účinku (Zhang a kol., 2008). Otagiri (2005) ve své práci uvedl, že většina léčivých látek se váže s velkou afinitou na jedno ze dvou vazebných míst HSA, která se označují číslicemi I a II.

Typické ligandy pro vazebné místo I jsou pravděpodobně dikarboxylové kyseliny a/nebo velké heterocyklické molekuly s negativním nábojem, který je umístěn ve středu molekuly. Mezi látky, které se váží na vazebné místo I, patří warfarin, dansylamid, n-butyl *p*-aminobenzoát aj. Vazebné místo I má velkou kapacitu, je flexibilní a obsahuje mnoho dalších specifických míst, které se většinou vzájemně ovlivňují. Je umístěno v subdoméně IIA

molekuly HSA a zahrnuje jediný tryptofan této bílkoviny (Trp-214). Tvarově toto vazebné místo připomíná kapsu, jejíž vnitřní stěny jsou vystavěny z hydrofobních postranních řetězců, zatímco vstupní část kapsy je obklopena pozitivně nabitými zbytky aminokyselin (Otagiri, 2005).

Ligandy, které se váží na *vazebné místo II* (nazývané také indolbenzodiazepinové vazebné místo), jsou často aromatické karboxylové kyseliny s negativně nabitou kyselou skupinou, která je separovaná od hydrofobního centra molekuly. K těmto kyselinám patří například dansylglycin nebo 7-alkylaminokumarin-4-ová kyselina. Vazebné místo II se zdá být menší (či užší) a méně flexibilní než vazebné místo I. Je umístěno v subdoméně IIIA molekuly HSA a tvarově je stejně jako vazebné místo I podobné kapse. Z aminokyselin, které se podílejí na stavbě vazebného místa II, jsou většinou jako ty nejdůležitější označovány arginin (Arg-410) a tyrosin (Tyr-411) (Otagiri, 2005).

Také některé metabolity léčivých látek se s velkou afinitou váží na molekulu HSA. Mnoho sloučenin s karboxylovou skupinou se metabolizuje převážně cestou glukuronidace a právě tyto elektrofilní metabolity kovalentně reagují s HSA *in vitro* i *in vivo*. Mezi léčivé látky, které po glukuronidaci kovalentně interagují s HSA, patří například furosemid, kyselina salicylová, gemfibrozil, tolmetin, ibuprofen, ibufenak a další (Otagiri, 2005).

## 2.3. Vybrané metody hodnocení interakce sloučenin s molekulou proteinu

### 2.3.1. Fluorescenční spektroskopie

Fluorescence je jedna z forem luminiscence, což je děj vyplývající z elektronových excitovaných stavů, kdy dochází k emisi světla z nějaké látky. Nastane-li tato emise záření jedním či více spontánními energetickými přechody, jedná se o fluorescenci. Fluorescence je pozorovatelná během buzení a po jeho konci prakticky mizí (doba dohasínání je obvykle řádově  $10^{-8}$  s). Většina složitých organických molekul nefluoreskuje, intenzivní fluorescenci vykazují některé aromatické sloučeniny nazývané fluorofory nebo fluorescenční barviva (Fišar, 2005).

Fluorescence proteinů je způsobena aromatickými aminokyselinami, které jsou v nich obsaženy: tryptofanem, tyrosinem a fenylalaninem (Fišar, 2004). Jelikož je podíl tryptofanu na emisi fotonů dominantní, používá se pro vnitřní fluorescenci bílkovin také termín tryptofanová fluorescence (Švehlová, 2007).

Tabulka č. 3: Fluorofory bílkovin a jejich charakteristiky z hlediska fluorescence (Hofr, 2007).

fluorofor	$\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ (nm)	kvantový výtěžek	doba života (ns)
tryptofan	295	353	0,13	3,1
tyrosin	275	304	0,14	3,6
fenylalanin	260	282	0,02	6,8

Řada nízkomolekulárních látek přírodního původu má schopnost zhaset fluorescenci. Toto zhášení fluorescence lze definovat jako bimolekulární proces, který snižuje kvantový výtěžek fluorescence. Může být důsledkem různých procesů. *Dynamické* (srážkové) *zhášení* nastává, když je fluorofor v excitovaném stavu deaktivován (tj. navrací se nezářivě do základního stavu) při srážce s molekulou zhasedla. Molekuly nejsou při tomto procesu chemicky změněny na rozdíl od *statického zhášení*, kdy se po kontaktu fluoroforu a zhasedla vytváří nefluorescenční komplex (Fišar, 2005).

Míra zhášení fluorescence naznačuje změnu v sekundární a terciární struktuře proteinu a v prostředí kolem fluoroforů bílkoviny. K popisu zhášení fluorescence se často využívá **Stern-Volmerovy rovnice**:

$$F_0/F = 1 + K_q \tau_0 c = 1 + K_{sv} c$$

kde  $F_0$  [AU] je intenzita fluorescence samotné molekuly,  $F$  [AU] je intenzita fluorescence v přítomnosti zhášedla,  $c$  [mol/l] je koncentrace zhášedla,  $K_q$  [l/mol/s] je bimolekulární zhášecí konstanta,  $K_{sv}$  [l/mol] je dynamická zhášecí konstanta ( $K_{sv} = K_q \tau_0$ ) a  $\tau_0$  [s] je doba dohasínání fluorescence bez přítomnosti zhášedla ( $10^{-8}$  s) (Yuan a kol., 2007).

Pokud je závislost podílu intenzit fluorescence  $F_0/F$  na koncentraci zhášedla  $c$  lineární, jedná se buď o zhášení dynamické nebo statické (Yuan a kol., 2007). Statické zhášení může být od dynamického rozlišeno pomocí porovnání bimolekulární zhášecí konstanty  $K_q$  s limitní difuzní konstantou  $K_{dif}$  ( $K_{dif} = 2,0 \times 10^{10}$  l/mol/s). Pokud platí, že  $K_q > K_{dif}$ , pak je hlavním mechanismem statické zhášení (Min a kol., 2004). Při exponenciální závislosti podílu intenzit fluorescence  $F_0/F$  na koncentraci zhášedla  $c$  je přítomné jak statické, tak dynamické zhášení (Papadopoulou a kol., 2005).

Je-li hlavním mechanismem zhášení statické, tj. při interakci zhášedla a molekuly bílkoviny vzniká nefluoreskující produkt, lze k výpočtu vazebných parametrů použít následující rovnici:

$$\log \frac{(F_0 - F)}{F} = \lg K_a + n \log c$$

kde  $F_0$  [AU] je intenzita fluorescence samotné molekuly,  $F$  [AU] je intenzita fluorescence v přítomnosti zhášedla,  $c$  [mol/l] je koncentrace zhášedla,  $K_a$  [l/mol] je vazebná konstanta a  $n$  je počet vazebných míst (Min a kol., 2004).

Vazebnou konstantu  $K_a$  lze využít k výpočtu změny Gibbsovy energie  $\Delta G$  [J/mol], která je definována vztahem:

$$\Delta G = -RT \ln K_a$$

kde  $R$  je molární plynová konstanta (8,314 J/K mol),  $T$  je teplota [K] a  $K_a$  je vazebná konstanta [l/mol] (Lázníčková a Kubiček, 2001).

Změny v sekundární struktuře proteinu mohou být hodnoceny tzv. zhášecím podílem  $Q$  [%]:

$$Q = (F_0 - F) / F_0$$

kde  $F_0$  [AU] je intenzita fluorescence samotné molekuly a  $F$  [AU] je intenzita fluorescence v přítomnosti zhášedce (Min a kol., 2004).

Fluorescenční spektra jsou často používána k popisu interakce různých látek s proteiny, protože poskytují informace o mikroprostředí v okolí chromoforu v bílkovinné molekule. Pokud vlivem přidání látky k bílkovině dochází ke zhášení tryptofanové fluorescence a posunu fluorescenčního spektra k nižším vlnovým délkám (modrý posun), znamená to, že okolí tryptofanu se stalo méně polárním. Naopak posun k vyšším vlnovým délkám (červený posun) naznačuje, že okolí tryptofanu se změnilo na polárnější (Zhang a kol., 2008).

### 2.3.2. UV-VIS absorpční spektroskopie

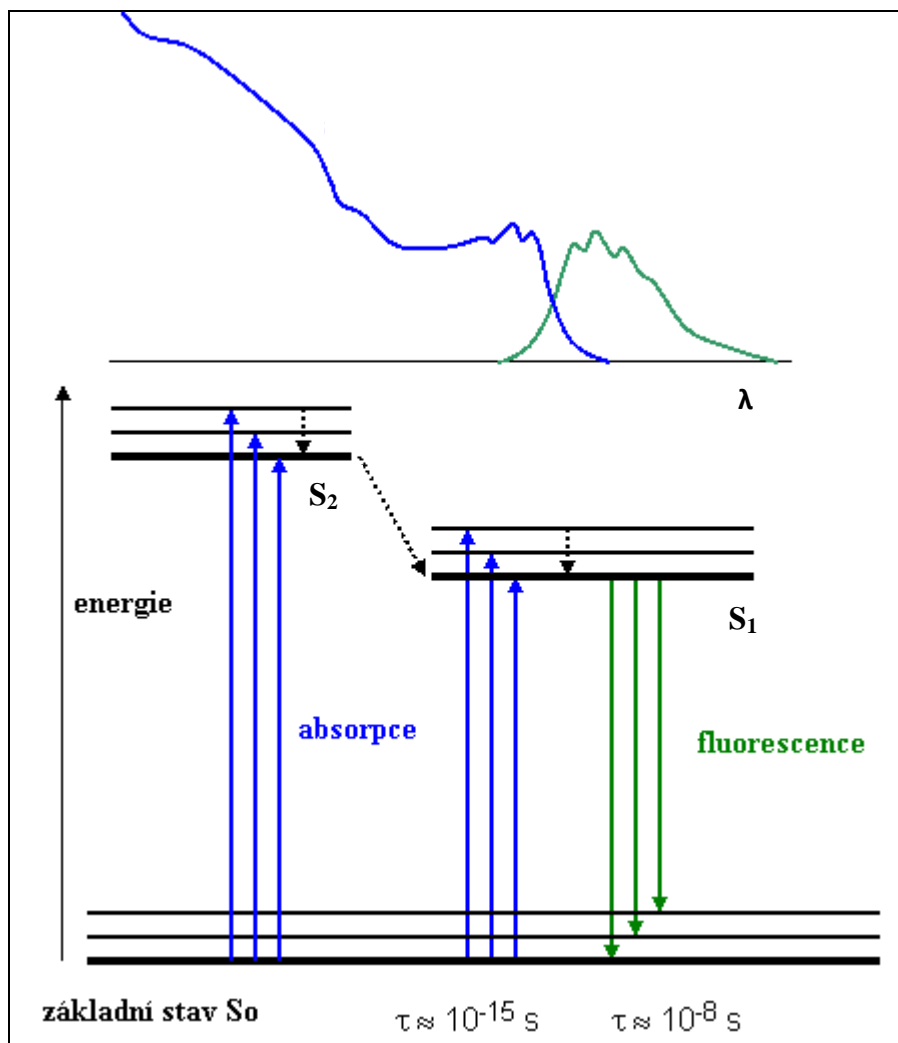
Absorpce světla je opačným dějem k emisi a představuje další možnou interakci látky s elektromagnetickým zářením. Prochází-li světlo homogenním hmotným prostředím, dochází k zeslabení jeho původní intenzity. To je způsobeno tím, že část původní energie světla je odražena, část rozptýlena a část se absorbuje. Absorbance je aditivní veličina definovaná jako záporný dekadický logaritmus vnitřní transmitance a podle Lambert-Beerova zákona je přímo úměrná koncentraci absorbujícího roztoku i tloušťce absorbující vrstvy.

Atomy zkoumané látky absorbují z elektromagnetického záření pouze ty fotony, jejichž energie odpovídá energii jednotlivých přeskoků elektronů při excitaci (Lázničková a Kubíček, 2001). V oblastech UV záření a viditelného světla (prakticky využívané vlnové délky 200-800 nm) mají fotony dostatečnou energii k excitaci elektronů, uskutečňují se zde především přechody  $\pi \rightarrow \pi^*$  (Švehlová, 2007). V molekule významně absorbují elektromagnetické záření z dané oblasti jen určité funkční skupiny označované jako chromofory. Příkladem chromoforu může být třeba skupina C=O, C=C nebo konjugované systémy (Lázničková a Kubíček, 2001). V molekulách bílkovin se nachází vícero chromoforů, z nichž jsou významné pásy tryptofanu (280 nm) a tyrosinu (274 nm), přičemž příspěvek

tryptofanu je dominantní (Švehlová, 2007). Peptidová vazba absorbuje při 210 - 220 nm (Vaňková, 1999). Změny konformace nebo denaturace bílkovin se mohou projevit změnou tvaru a polohou absorpčního spektra. Podle směru posunu maxim absorbance se rozlišuje posun červený (bathmochromní, k vyšším vlnovým délkám) a modrý (hypsochromní, k nižším vlnovým délkám) (Švehlová, 2007). Posun k vyšší absorbanci je hyperchromní, posun k nižší absorbanci je hypochromní (Lázníčková a Kubíček, 2001).

Absorpční spektroskopie je do určité míry použitelná pro strukturální studie. Může se jednat o stabilitní měření, sledování vazby ligandu, zkoumání vazebných míst apod. Při studování interakcí látek s enzymy lze pomocí absorpčních spekter pozorovat interakce jak s proteinovou částí enzymu, tak s jeho koenzymem. V kratších vlnových délkách je pozorovatelná změna v samotné proteinové části enzymu a od 320 nm vlastnosti jeho koenzymu (Švehlová, 2007).

Kromě dvou výše uvedených metod, které jsem využívala v experimentální části, existují i jiné metody hodnocení interakce sloučenin s molekulou proteinu. Mezi tyto další hojně využívané metody patří: nukleární magnetická rezonance (NMR), cirkulární dichroismus (CD), Ramanova spektroskopie a infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací a s ATR nástavcem (ATR-FTIR).



Obrázek č. 6: Zjednodušené schéma absorpce a fluorescence. S<sub>1</sub> a S<sub>2</sub> jsou excitované singletové stavy,  $\tau$  je doba trvání absorpce resp. fluorescence. Přerušované šipky znázorňují nezářivé přechody, modré šipky znázorňují absorpci světelného kvanta budícího záření, zelené šipky znázorňují deexcitaci zářivým přechodem (fluorescenci). V horní části obrázku jsou tvary absorpčních a emisních spekter (Fišar, 2005).

### **3. CÍLE PRÁCE**

#### **1) Sledování stability vybraných přírodních antioxidantů (apigenin, naringenin, kaempferol)**

- v čase za fyziologických podmínek (37°C, pH 7,4) v *in vitro* modelu.
- při jejich uchovávání při třech různých teplotách (-20°C, 4°C, 25°C).

#### **2) Sledování interakce vybraných přírodních antioxidantů (apigenin, naringenin, kaempferol) s molekulou HSA**

- pomocí UV-VIS absorpční spektroskopie za fyziologických podmínek (37°C, pH 7,4) v *in vitro* modelu.
- pomocí fluorescenční spektroskopie (metoda zhášení tryptofanové fluorescence) za fyziologických podmínek (37°C, pH 7,4) v *in vitro* modelu.

#### **3) Srovnání rozpustnosti přírodních antioxidantů (apigenin, naringenin, kaempferol) v použitých rozpouštědlech**

## **4. MATERIÁL A METODIKA**

### **4.1. Použitý materiál**

Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát p.a.	Penta Chrudim
Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát p.a.	Lachema Neratovice
Azid sodný p.a.	Lachema Neratovice
Redestilovaná voda	Katedra biochemických věd
Methanol p.a.	Penta Chrudim
Hydroxid sodný p.a.	Lachema Neratovice
Apigenin, 95%	Sigma-Aldrich, Německo
Naringenin, 95%	Sigma-Aldrich, Německo
Kaempferol, 96%	Sigma-Aldrich, Německo
Human serum albumin, 96 - 99%	Sigma-Aldrich, Německo

### **4.2. Použitá zařízení**

Digitální analytické váhy Sartorius CP 225D  
Předvážky Sartorius BL 310  
pH-metr inoLab pH Level 2  
Fluorescenční spektrofotometr Perkin-Elmer LS 50B  
Spektrofotometr Helios  $\beta$   
Inkubátor Memmert  
Magnetické míchadlo  
Ultrazvuk Ultrasonic Cleaner

## 4.3. Metodika

### 4.3.1. Příprava roztoků

#### 4.3.1.1. *Příprava 0,1 M fosfátového pufru (pH 7,4)*

Připravila jsem 0,1 M fosfátový pufr o pH 7,4 s přídavkem  $\text{NaN}_3$  jako antimikrobiální látky. Nejdříve jsem připravila 1 litr 0,2 M roztoku  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  v redestilované vodě a tento roztok jsem 15 minut míchala za použití magnetického míchadla. Následně jsem připravila 500 ml roztoku  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  v redestilované vodě a opět jsem jej 15 minut míchala na magnetickém míchadle. Poté jsem smísila 190 ml 0,2 M roztoku  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  s 810 ml 0,2 M roztoku  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  a 1000 ml redestilované vody. Přidala jsem 1 g  $\text{NaN}_3$  a 20 minut jsem výsledný roztok míchala na magnetickém míchadle. Na závěr jsem zkontrolovala pH připraveného pufru pomocí pH-metru, popřípadě upravila jeho hodnotu na 7,4 přídavkem roztoku  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  nebo  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ .

#### 4.3.1.2. *Příprava 20 mM roztoku NaOH*

Roztok jsem připravila rozpuštěním přesné navážky NaOH v příslušném množství redestilované vody.

#### 4.3.1.3. *Příprava 16 $\mu\text{M}$ roztoku HSA v 0,1 M fosfátovém pufru (pH 7,4)*

Roztok jsem získala rozpuštěním přesné navážky HSA v příslušném množství 0,1 M fosfátového pufru (pH 7,4).

#### 4.3.1.4. *Příprava 4 $\mu\text{M}$ roztoku HSA v 0,1 M fosfátovém pufru (pH 7,4)*

Roztok jsem připravila rozpuštěním přesné navážky HSA v příslušném množství 0,1 M fosfátového pufru (pH 7,4).

#### 4.3.1.5. *Příprava 10 mM roztoků antioxidantů v MeOH*

Roztoky jednotlivých antioxidantů (apigenin, naringenin, kaempferol) jsem připravila rozpuštěním přesné navážky antioxidantu v příslušném množství bezvodého MeOH za použití ultrazvuku.

#### 4.3.1.6. Příprava 5 mM roztoků antioxidantů v MeOH

Roztoky jednotlivých antioxidantů (apigenin, naringenin, kaempferol) jsem připravila vhodným naředěním 10 mM roztoku příslušného antioxidantu v bezvodém MeOH.

#### 4.3.1.7. Příprava 10 mM roztoků antioxidantů ve 20 mM NaOH

Roztoky jednotlivých antioxidantů (apigenin, naringenin, kaempferol) jsem připravila rozpuštěním přesné navážky antioxidantu v příslušném množství 20 mM NaOH za použití ultrazvuku.

### 4.3.2. Sledování stability vybraných antioxidantů

#### 4.3.2.1. Sledování stability antioxidantů v čase za fyziologických podmínek

V tomto experimentu jsem sledovala stability jednotlivých antioxidantů pomocí UV-VIS absorpční spektroskopie. Všechny inkubační směsi jsem připravovala podle níže uvedené tabulky a to pro každý antioxidant (apigenin, naringenin, kaempferol) v duplikátu. Zkumavky jsem důkladně promísila, uzavřela a utěsnila parafilmem, abych zabránila případnému nežádoucímu odpařování rozpouštědla. Vzorky jsem inkubovala v rozsahu čtyř týdnů při teplotě 37°C.

Tabulka č. 4: Složení inkubační směsi při sledování stability antioxidantů v čase za fyziologických podmínek (37°C, pH 7,4).

pipetovaný objem příslušných roztoků [μl]	číslo zkumavky			
	1	2	3	4
pufr	1500	1500	1500	1500
MeOH	7,5	0	0	0
20 mM NaOH	0	7,5	0	0
10 mM antioxidant v MeOH	0	0	7,5	0
10 mM antioxidant v 20 mM NaOH	0	0	0	7,5
celkový objem	1507,5			

V časových intervalech 0, 1 hodina, 1 den, 7 dní, 14 dní, 21 dní a 28 dní jsem vzorky proměřila na spektrofotometru Helios β. Absorpční spektra jsem zaznamenávala v rozsahu vlnových délek 190 až 550 nm a jako srovnávací roztok jsem použila redestilovanou vodu. Měření jsem prováděla v duplikátu a získaná data jsem zprůměrovala. Při vyhodnocování dat jsem odečetla příslušný slepý vzorek (roztoky 1 a 2) od daného vzorku a následně jsem vytvořila graf závislosti absorbance na vlnové délce.

Tabulka č. 5: Způsob vyhodnocení absorpčních spekter při sledování stability antioxidantů v čase za fyziologických podmínek (37°C, pH 7,4).

absorpční spektrum	vyhodnocení
antioxidant v MeOH	3 – 1
antioxidant v NaOH	4 – 2

#### 4.3.2.2 Sledování stability antioxidantů při jejich uchovávání při třech různých teplotách

Sledování stability jednotlivých antioxidantů jsem prováděla pomocí UV-VIS absorpční spektroskopie. Připravila jsem si 10 mM roztoky jednotlivých antioxidantů (apigenin, naringenin, kaempferol) v MeOH a v 20 mM NaOH. Poté jsem každý roztok rozdělila na tři části. Všechny zkumavky jsem utěsnila parafilmem, aby v průběhu experimentu nedošlo k případnému nežádoucímu odpaření rozpouštědla, a po dobu čtyř týdnů jsem jednotlivé části uchovávala při třech různých teplotách (-20°C, 4°C, 25°C). Po uplynutí této doby jsem z každé části připravila vzorek k měření podle níže uvedené tabulky. Každý vzorek jsem připravila v duplikátu.

Tabulka č. 6: Složení inkubační směsi při sledování stability antioxidantů při jejich uchovávání při třech různých teplotách (-20°C, 4°C, 25°C).

pipetovaný objem příslušných roztoků [μl]	zkumavka			
	M	SM	N	SN
pufr	1500	1500	1500	1500
MeOH	0	7,5	0	0
20 mM NaOH	0	0	0	7,5
10 mM antioxidant v MeOH	7,5	0	0	0
10 mM antioxidant v 20 mM NaOH	0	0	7,5	0
celkový objem	1507,5			

Vzorky jsem proměřila na spektrofotometru Heλios β. Absorpční spektra jsem zaznamenávala v rozsahu vlnových délek 190 až 550 nm a jako srovnávací roztok jsem použila redestilovanou vodu. Měření jsem prováděla v duplikátu a získaná data jsem zprůměrovala. Při vyhodnocování dat jsem odečetla příslušný slepý vzorek (roztoky SM a SN) od daného vzorku a následně jsem vytvořila graf závislosti absorbance na vlnové délce.

Tabulka č. 7: Způsob vyhodnocení absorpčních spekter při sledování stability antioxidantů při uchovávání ve třech různých teplotách (-20°C, 4°C, 25°C).

absorpční spektrum	vyhodnocení
antioxidant v MeOH	M - SM
antioxidant v NaOH	N - SN

### 4.3.3. Sledování interakce vybraných antioxidantů s molekulou HSA

#### 4.3.3.1. Sledování interakce antioxidantů s molekulou HSA pomocí UV-VIS absorpční spektroskopie za fyziologických podmínek (37°C, pH 7,4)

Všechny inkubační směsi jsem připravovala podle níže uvedené tabulky a to pro každý antioxidant (apigenin, naringenin, kaempferol) v duplikátu. Zkumavky jsem důkladně promísila, uzavřela a utěsnila parafilmem, abych zabránila případnému nežádoucímu odpařování rozpouštědla. Vzorky jsem inkubovala v rozsahu čtyř týdnů při teplotě 37°C.

Tabulka č. 8: Složení inkubační směsi při sledování interakce antioxidantů s molekulou HSA pomocí UV-VIS absorpční spektroskopie za fyziologických podmínek (37°C, pH 7,4).

pipetovaný objem příslušných roztoků [μl]	zkumavka							
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	B	C
16 μM HSA v pufru	1500	0	0	0	0	0	1500	1500
pufr	0	1500	1500	1500	1500	1500	0	0
MeOH	0	7,5	0	0	0	0	0	0
20 mM NaOH	0	0	7,5	0	0	0	0	0
10 mM antioxidant v MeOH	0	0	0	7,5	0	0	7,5	0
10 mM antioxidant v 20 mM NaOH	0	0	0	0	7,5	0	0	7,5
celkový objem	1500	1507,5						

V časových intervalech 0, 1 hodina, 1 den, 7 dní, 14 dní, 21 dní a 28 dní jsem vzorky proměřila na spektrofotometru Helios  $\beta$ . Absorpční spektra jsem zaznamenávala v rozsahu vlnových délek 190 až 550 nm a jako srovnávací roztok jsem použila redestilovanou vodu. Měření jsem prováděla v duplikátu a získaná data jsem zprůměrovala. Při vyhodnocování dat jsem odečetla příslušný slepý vzorek (roztoky A2 - A6) od daného vzorku a následně jsem vytvořila graf závislosti absorbance na vlnové délce.

Tabulka č. 9: Způsob vyhodnocení absorpčních spekter při sledování interakce antioxidantů s molekulou HSA pomocí UV-VIS absorpční spektroskopie za fyziologických podmínek (37°C, pH7,4).

<b>absorpční spektrum</b>	<b>vyhodnocení</b>
interakce HSA s antioxidantem v MeOH	B - A2
interakce HSA s antioxidantem v NaOH	C - A3
HSA po interakci s antioxidantem v MeOH	B - A4
HSA po interakci s antioxidantem v NaOH	C - A5
HSA	A1 - A6

*4.3.3.2 Sledování interakce antioxidantů s molekulou HSA pomocí fluorescenční spektroskopie (metoda zhášení tryptofanové fluorescence) za fyziologických podmínek (37°C, pH 7,4)*

Nejdříve jsem si připravila zásobní 5 mM roztoky jednotlivých antioxidantů (apigenin, naringenin, kaempferol) v bezvodém MeOH. Následně jsem za stálého míchání prováděla fluorimetrickou titraci 3 ml 4  $\mu$ M HSA tímto zásobním roztokem (viz tabulka č. 10), který jsem po dobu experimentu uchovávala v kádince s ledem. Fluorescenci jsem měřila vždy po uplynutí pětiminutového intervalu po každém přidavku.

Tabulka č. 10: Složení titrační směsi při sledování interakce antioxidantů s molekulou HSA pomocí fluorescenční spektroskopie (metoda zhášení tryptofanové fluorescence) za fyziologických podmínek (37°C, pH 7,4).

pipetovaný objem příslušných roztoků [μl]	číslo titračního přídávku								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
4μM HSA v pufru	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000
5 mM antioxidant v MeOH	0	1,5	3,0	4,5	6,0	7,5	9,0	10,5	12,0
celkový objem	3000	3001,5	3003	3004,5	3006	3007,5	3009	3010,5	3012
koncentrace antioxidantu [μM]	0	2,5	5,0	7,5	10,0	12,5	15,0	17,5	20,0

Měření jsem prováděla na fluorescenčním spektrofotometru Perkin-Elmer LS 50B při excitační vlnové délce, která odpovídá fluorescenci aromatické aminokyseliny tryptofanu v molekule HSA, tj. 295 nm. Emisní spektra jsem zaznamenávala v rozsahu vlnových délek 290 - 540 nm. Excitační i emisní šterbinu jsem nastavila na 5 nm a skenování probíhalo rychlostí 200 nm/minutu. Všechny vzorky jsem připravovala v triplicátu, výsledná data jsem zprůměrovala a vytvořila graf závislosti intenzity fluorescence na emisní vlnové délce. Získaná data jsem také vyhodnotila Stern-Volmerovou analýzou.

## 5. VÝSLEDKY

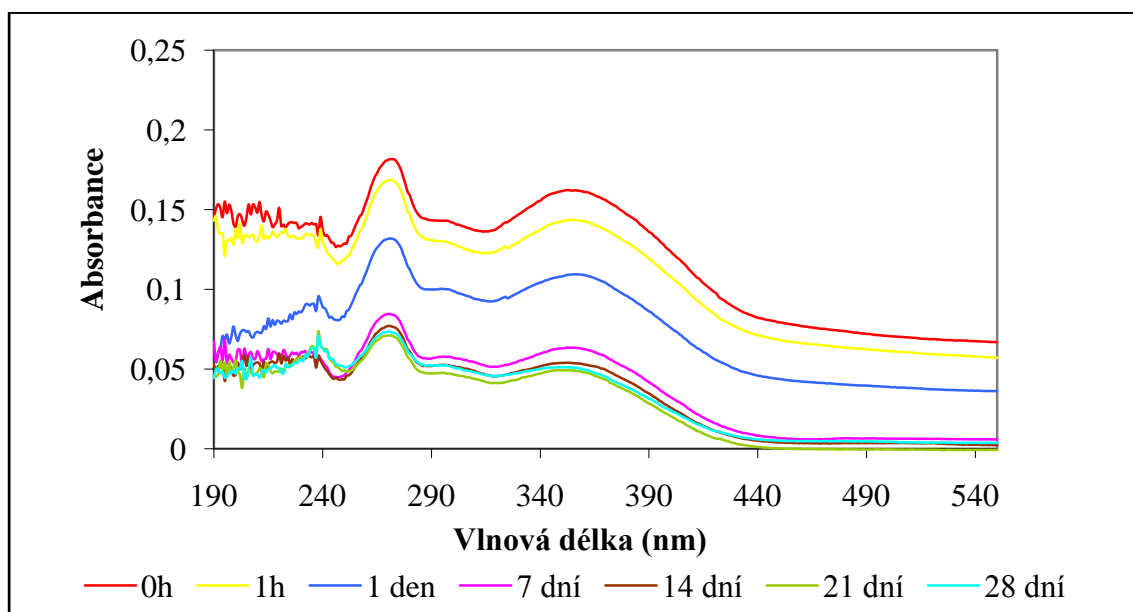
### 5.1. Sledování stability vybraných antioxidantů

#### 5.1.1. Sledování stability vybraných antioxidantů v čase za fyziologických podmínek

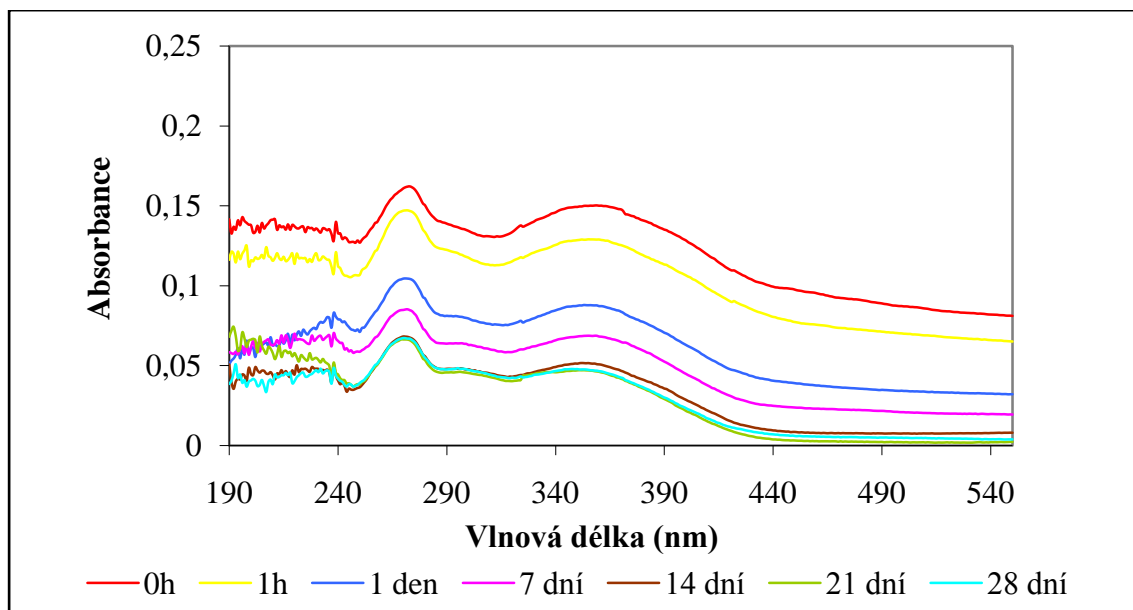
Stabilitu vybraných přírodních antioxidantů (apigenin, naringenin, kaempferol) jsem prověřovala pomocí UV-VIS absorpční spektroskopie při inkubaci trvající 28 dní za fyziologických podmínek (37°C, pH 7,4). K přípravě roztoků antioxidantů jsem použila dvě rozpouštědla (bezvodý MeOH a 20 mM NaOH). Absorpční spektra jsem zaznamenávala na spektrofotometru Helios β v rozsahu vlnových délek 190-550 nm.

##### 5.1.1.1. Apigenin

Apigenin byl při 37°C v rozsahu čtyřtýdenního experimentu stabilní v obou rozpouštědlech. Nedocházelo ke změně charakteristického tvaru absorpční křivky, ani ke změně vlnových délek u maxim absorbance. V obou rozpouštědlech ale časem docházelo k postupnému snižování absorbance, přičemž k největšímu poklesu došlo během prvních 7 dnů. Na absorpční křivce apigeninu byly patrné dva hlavní absorpční pásy. V prostředí bezvodého MeOH pás I 314-440 nm, pás II 253-282 nm a v prostředí 20 mM NaOH pás I 317-430 nm, pás II 247-282 nm.



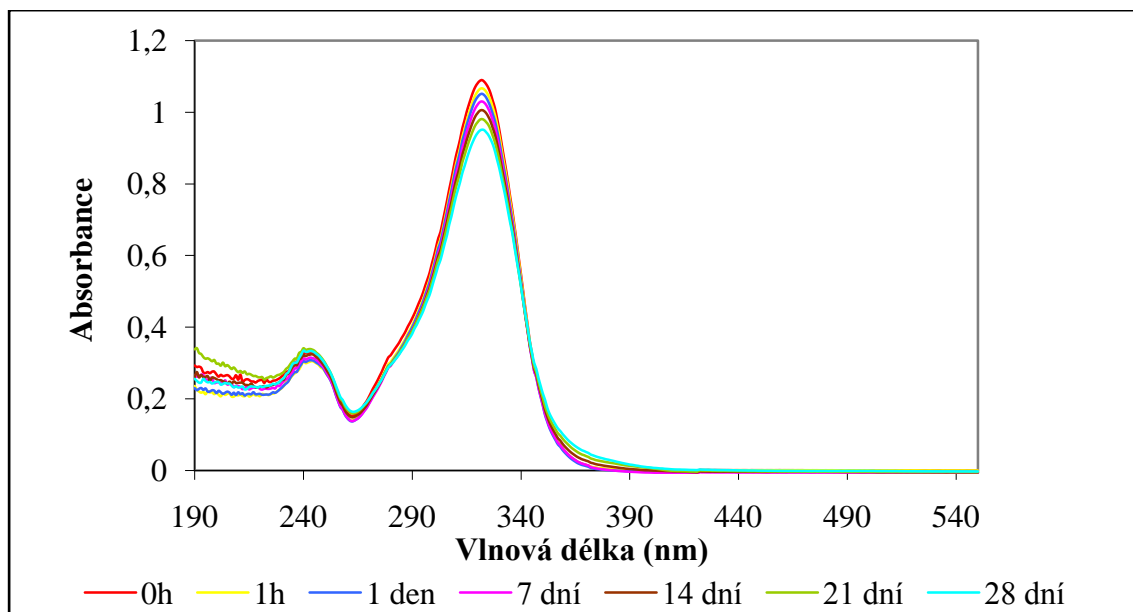
Obrázek č. 7: UV-VIS absorpční spektra 50 μM apigeninu (zásobní roztok v bezvodém MeOH) za fyziologických podmínek (37°C, pH 7,4).



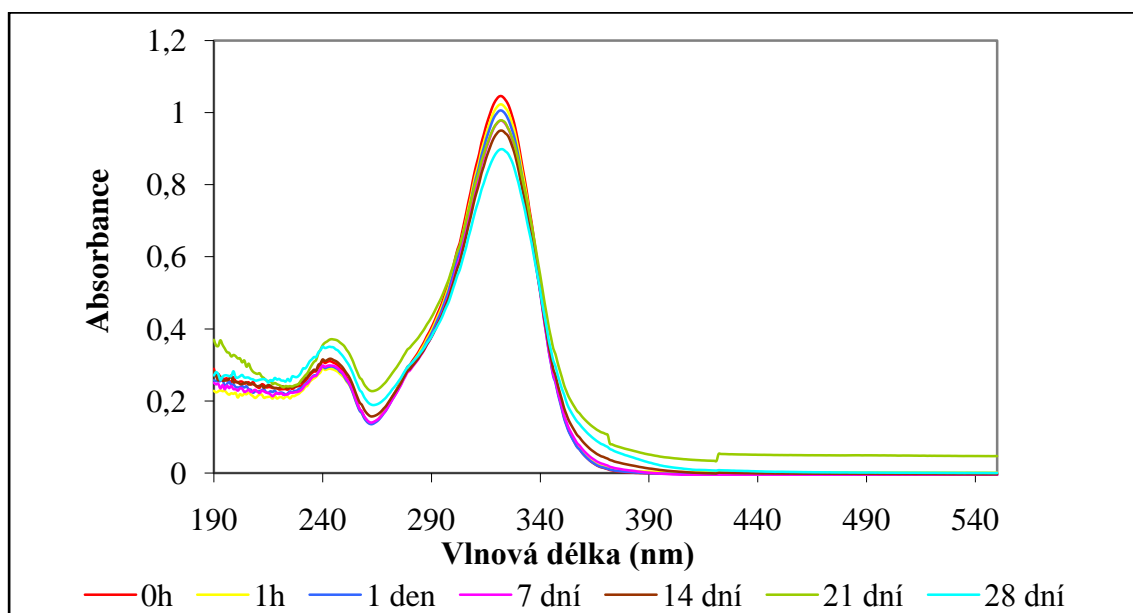
Obrázek č. 8: UV-VIS absorpční spektra 50 µM apigeninu (zásobní roztok v 20 mM NaOH) za fyziologických podmínek (37°C, pH 7,4).

#### 5.1.1.2. Naringenin

Naringenin byl při 37°C po dobu čtyř týdnů stabilní. V obou rozpouštědlech docházelo k mírnému snížení i zvýšení absorbance, ale charakteristický tvar křivky a maxima absorbance zůstaly zachovány. Na absorpční křivce naringeninu byly patrné dva hlavní absorpční pásy. V prostředí bezvodého MeOH pás I 260-367 nm, pás II 220-261 nm a v prostředí 20 mM NaOH pás I 260-374 nm, pás II 225-260 nm.



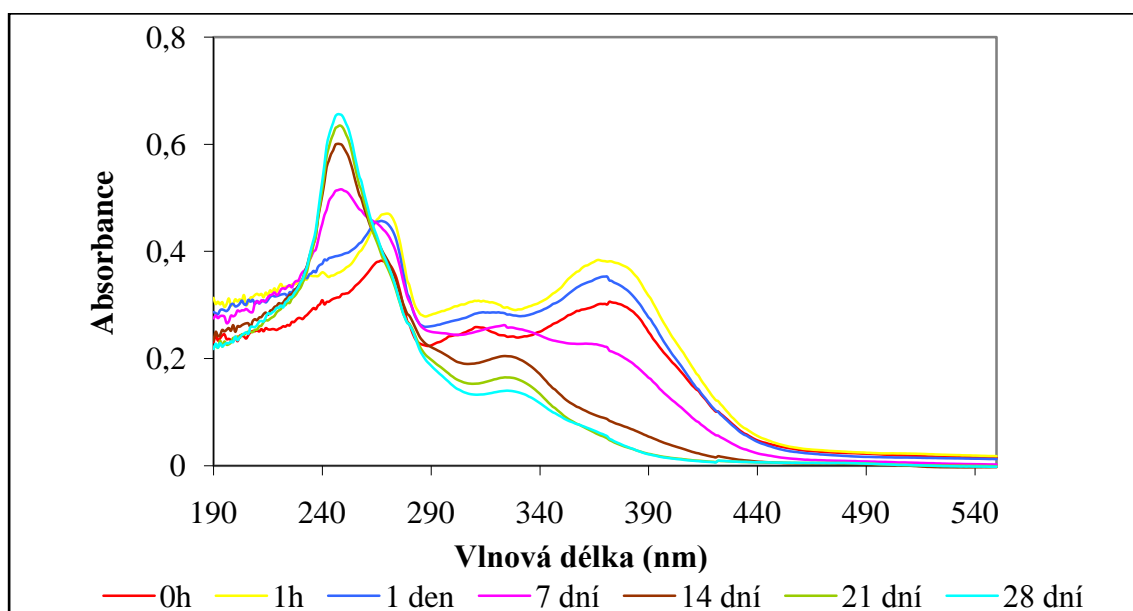
Obrázek č. 9: UV-VIS absorpční spektra 50 µM naringeninu (zásobní roztok v bezvodém MeOH) za fyziologických podmínek (pH 7,4, 37°C).



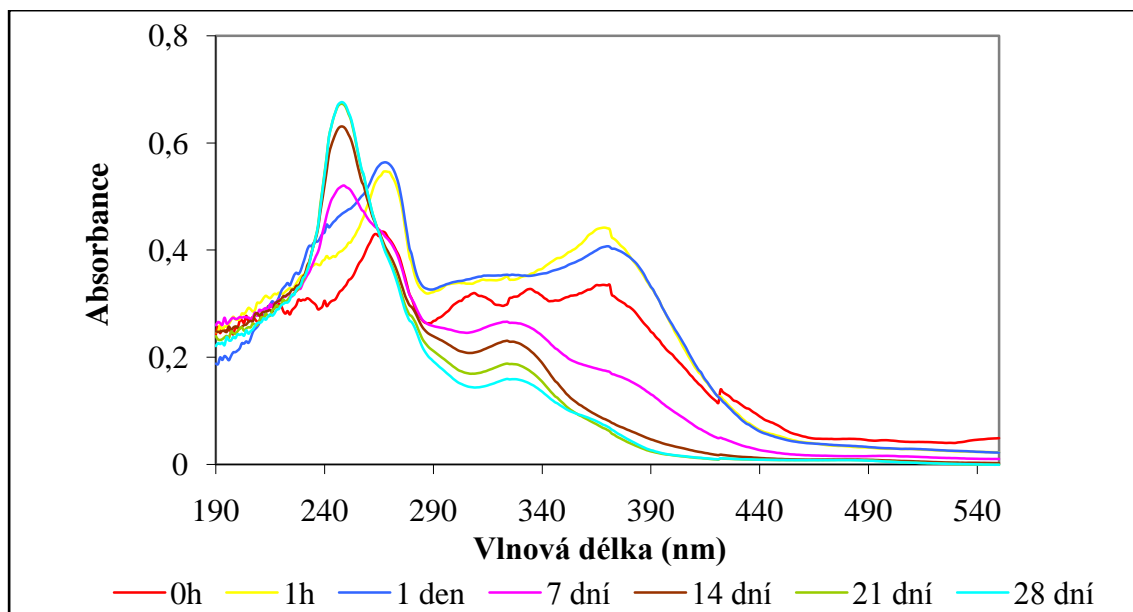
Obrázek č. 10: UV-VIS absorpční spektra 50 µM naringeninu (zásobní roztok v 20 mM NaOH) za fyziologických podmínek (37°C, pH 7,4).

#### 5.1.1.3. Kaempferol

Kaempferol byl při 37°C stabilní po dobu 1 dne. Tvary absorpčních křivek odpovídající těmto časovým intervalům nebyly změněny a nedocházelo zde k posunu vlnových délek u maxim absorbance, i když v prostředí 20 mM NaOH už byla patrná mírná deformace spektra. S dalším postupem času se kaempferol jevil v obou rozpouštědlech jako nestabilní. Docházelo ke změnám tvaru křivek i k posunu maxim absorbance směrem k nižším vlnovým délkám. Tyto změny proběhly nejvýrazněji během prvních 7 dnů. Na absorpční křivce kaempferolu byly patrné dva hlavní absorpční pásy, které jsem odečetla z obrázku č. 11: pás I 328-443 nm, pás II 248-283 nm.



Obrázek č. 11: UV-VIS absorpční spektra 50 µM kaempferolu (zásobní roztok v bezvodém MeOH) za fyziologických podmínek (37°C, pH 7,4).



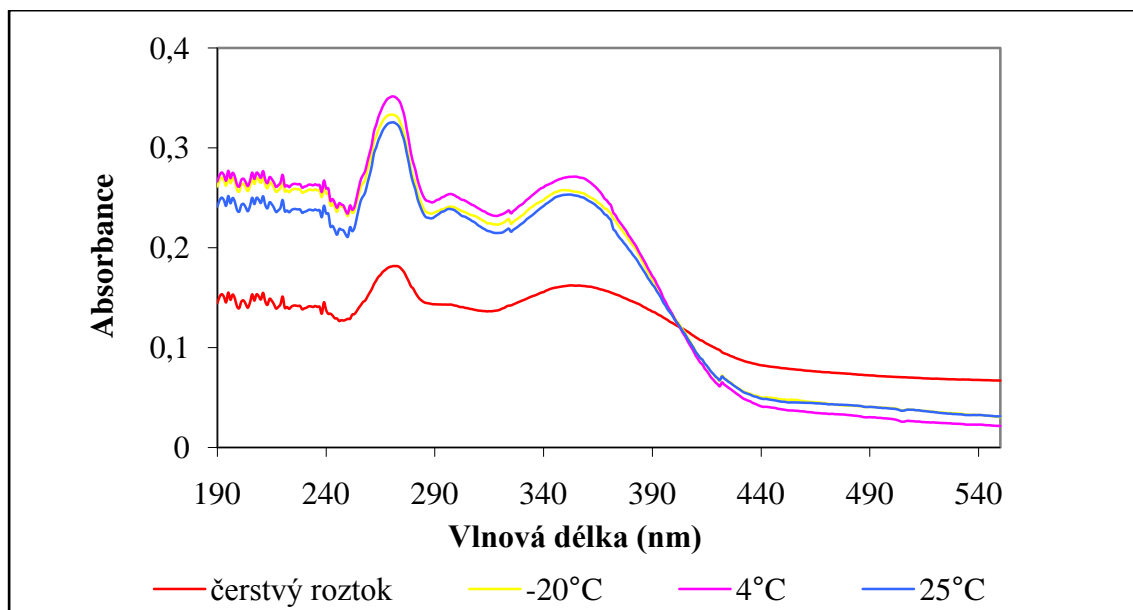
Obrázek č. 12: UV-VIS absorpční spektra 50  $\mu$ M kaempferolu (zásobní roztok v 20 mM NaOH) za fyziologických podmínek (37°C, pH 7,4).

### 5.1.2. Sledování stability vybraných antioxidantů při jejich uchovávání při třech různých teplotách

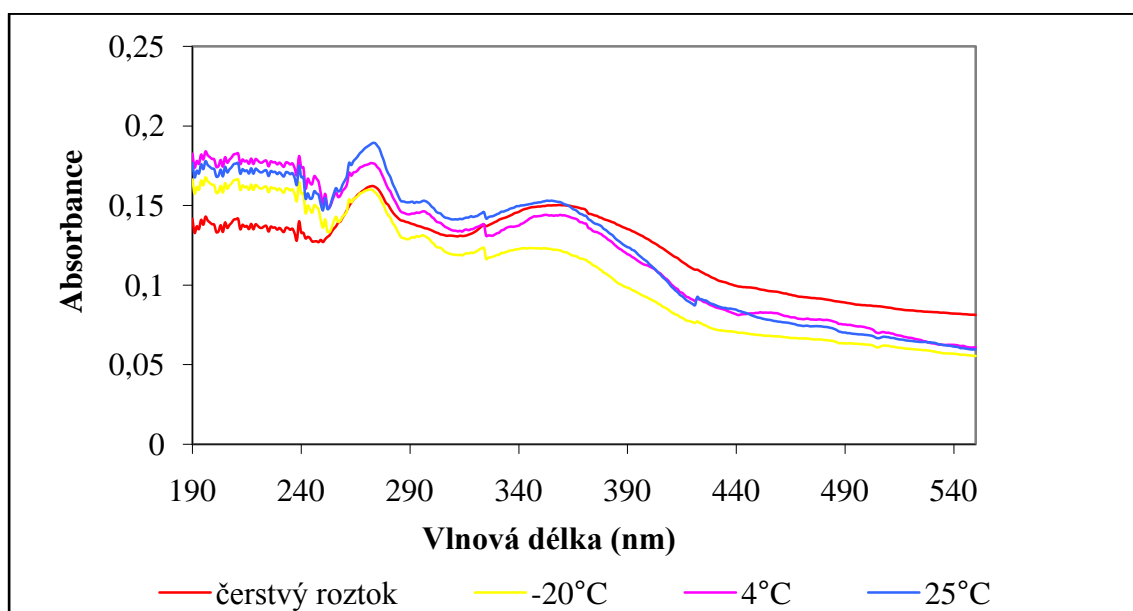
Vliv teploty na stabilitu vybraných antioxidantů (apigenin, naringenin, kaempferol) jsem posuzovala pomocí UV-VIS absorpční spektroskopie. Absorpční spektra jsem měřila po uplynutí čtyřtýdenní doby, po kterou jsem roztoky antioxidantů (v bezvodém MeOH a 20 mM NaOH) uchovávala při třech různých teplotách (-20°C, 4°C, 25°C). Spektra jsem zaznamenávala na spektrofotometru Helios  $\beta$  v rozsahu vlnových délek 190-550 nm.

#### 5.1.2.1. Apigenin

V prostředí bezvodého MeOH došlo u apigeninu ke zvýšení absorbance. V prostředí 20 mM NaOH došlo pouze k mírným výkyvům hodnot absorbance směrem k vyšším i k nižším hodnotám. Výrazný vliv rozdílných teplot na výsledek ale nebyl patrný, u všech křivek zůstaly zachované charakteristické rysy, apigenin byl tedy stabilní.



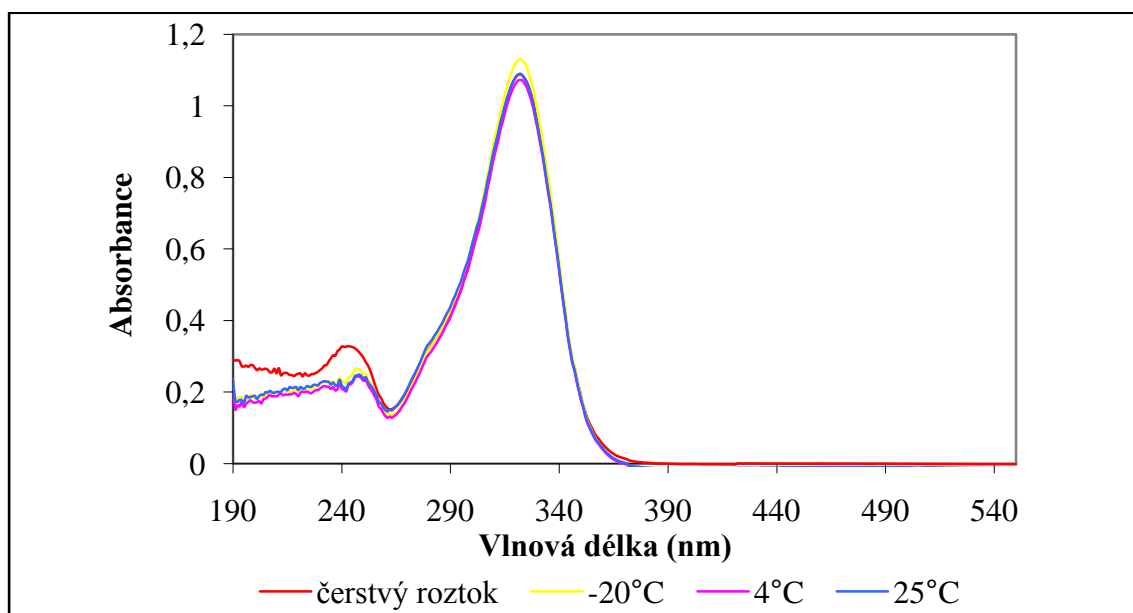
Obrázek č. 13: UV-VIS absorpční spektra 50  $\mu$ M apigeninu (zásobní roztok v bezvodém MeOH) čerstvého roztoku a roztoků uchovávaných při třech různých teplotách po dobu 28 dní.



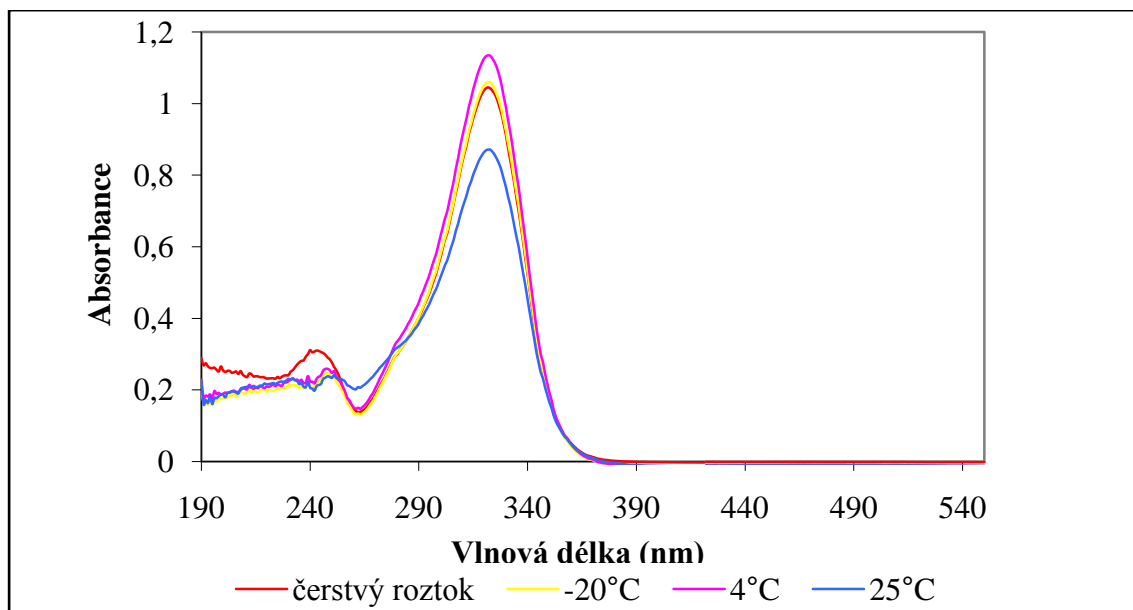
Obrázek č. 14: UV-VIS absorpční spektra 50  $\mu$ M apigeninu (zásobní roztok v 20 mM NaOH) čerstvého roztoku a roztoků uchovávaných při třech různých teplotách po dobu 28 dní.

#### 5.1.2.2. Naringenin

Naringenin se v tomto experimentu jevil stabilně v obou rozpouštědlech bez ohledu na rozdílné teploty, při nichž byl uchováván. Charakteristické tvary všech spekter zůstaly zachovány. Po rozpuštění v bezvodém MeOH bylo viditelné mírné zvýšení absorpce při teplotě  $-20^{\circ}\text{C}$ . Při použití 20 mM NaOH jako rozpouštědla došlo k posunu absorpce směrem k vyšším hodnotám (teplota  $4^{\circ}\text{C}$ ) i k nižším hodnotám (teplota  $25^{\circ}\text{C}$ ).



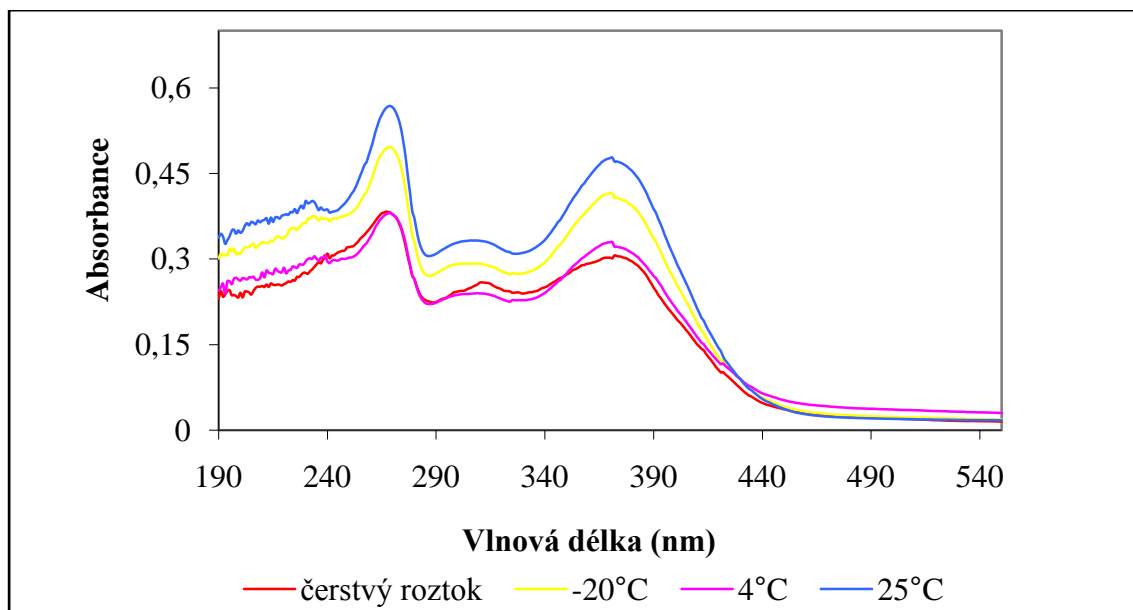
Obrázek č. 15: UV-VIS absorpční spektra 50  $\mu\text{M}$  naringeninu (zásobní roztok v bezvodém MeOH) čerstvého roztoku a roztoků uchovávaných při třech různých teplotách po dobu 28 dní.



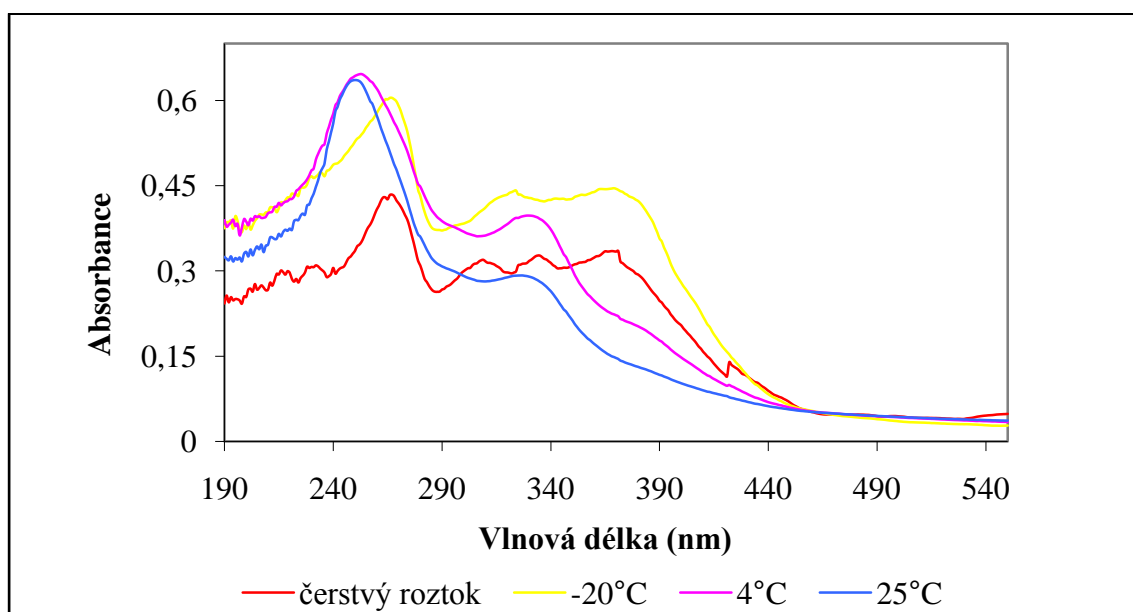
Obrázek č. 16: UV-VIS absorpční spektra 50  $\mu\text{M}$  naringeninu (zásobní roztok v 20 mM NaOH) čerstvého roztoku a roztoků uchovávaných při třech různých teplotách po dobu 28 dní.

#### 5.1.2.3. *Kaempferol*

Při použití bezvodého MeOH jako rozpouštědla došlo u kaempferolu ke zvýšení absorbance a to za teploty 25°C a -20°C. Tvary všech křivek zůstaly beze změn, kaempferol se v tomto rozpouštědle choval stabilně. Rozdílné výsledky ale vyšly s použitím 20 mM NaOH jako rozpouštědla. Kaempferol zde vykazoval největší stabilitu při nejnižší teplotě -20°C, zatímco za teploty 4°C a 25°C se jevil nestabilně, což dokazuje změna tvaru těchto křivek i posun vlnových délek u maxim absorbance směrem k nižším hodnotám.



Obrázek č. 17: UV-VIS absorpční spektra 50  $\mu$ M kaempferolu (zásobní roztok v bezvodém MeOH) čerstvého roztoku a roztoků uchovávaných při třech různých teplotách po dobu 28 dní.



Obrázek č. 18: UV-VIS absorpční spektra 50  $\mu$ M kaempferolu (zásobní roztok v 20 mM NaOH) čerstvého roztoku a roztoků uchovávaných při třech různých teplotách po dobu 28 dní.

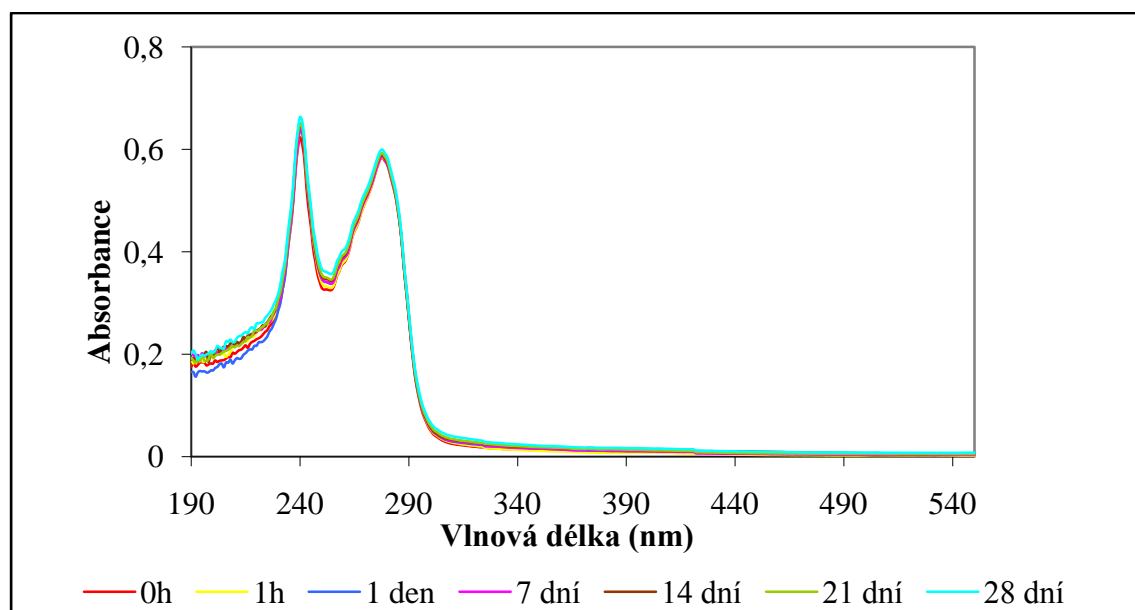
## 5.2. Sledování interakce vybraných antioxidantů s molekulou HSA

### 5.2.1. Sledování interakce antioxidantů s molekulou HSA pomocí UV-VIS absorpční spektroskopie za fyziologických podmínek (37°C, pH 7,4)

Interakci vybraných přírodních antioxidantů (apigenin, naringenin, kaempferol) jsem nejdříve pozorovala pomocí UV-VIS absorpční spektroskopie za fyziologických podmínek (37°C, pH 7,4). K přípravě roztoků antioxidantů jsem použila dvě rozpouštědla (bezvodý MeOH a 20 mM NaOH). Absorpční spektra jsem měřila v časových intervalech v průběhu 28 dní na spektrofotometru Helios  $\beta$  v rozsahu vlnových délek 190-550 nm.

#### 5.2.1.1. HSA

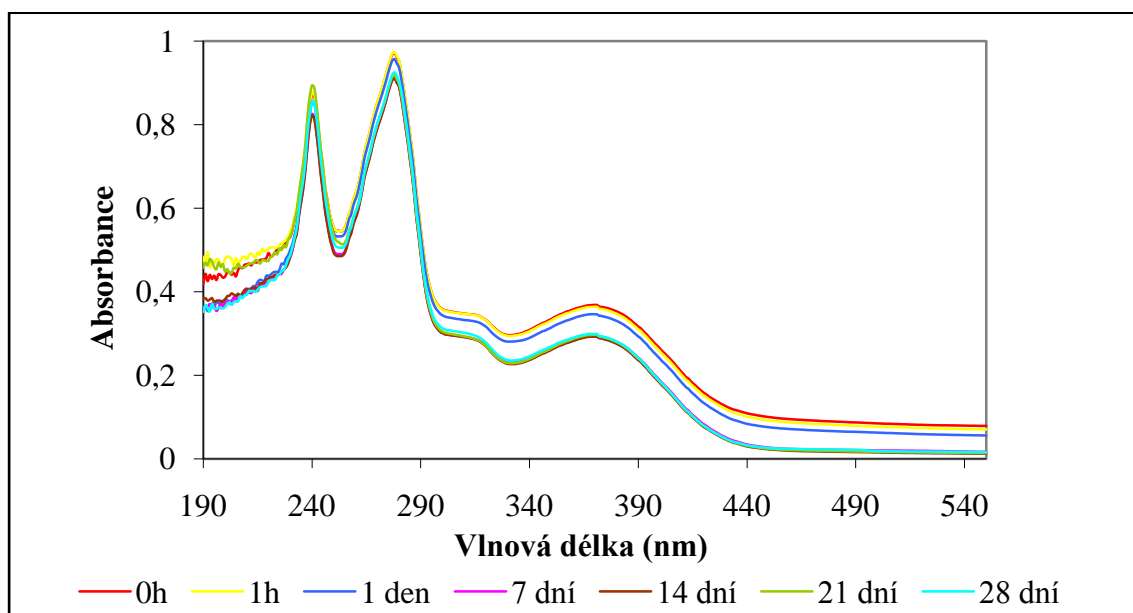
Molekula HSA se v průběhu 28 dní neměnila, tj. nedocházelo ke změnám charakteristického tvaru spektra ani k žádným posunům. Na absorpčním spektru byla patrná dvě maxima absorbance odpovídající vlnovým délkám 240 nm a 276 nm.



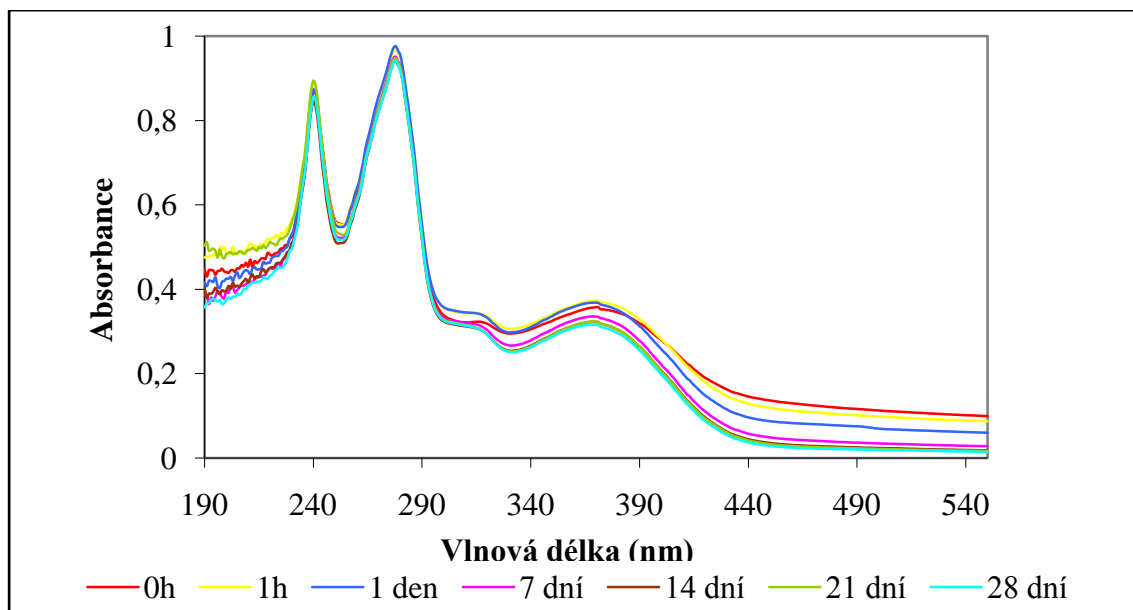
Obrázek č. 19: UV-VIS absorpční spektra 16 μM HSA za fyziologických podmínek (37°C, pH 7,4).

#### 5.2.1.2. Interakce HSA s apigeninem

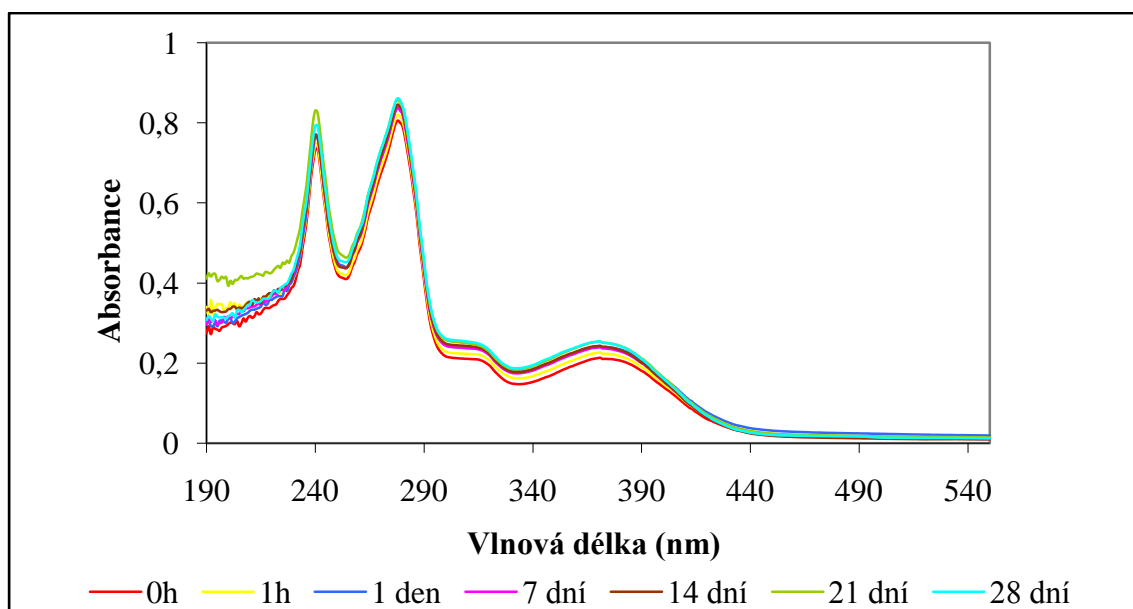
Absorpční spektra interakce HSA s apigeninem a rozdílová spektra HSA po interakci s apigeninem byla v porovnání s absorpčními spektry samotné molekuly HSA rozdílná. Došlo ke zvýšení absorbance ale ne k posunu vlnových délek maxim 240 nm a 276 nm. Vznikl nový absorpční pás, který odpovídá vlnovým délkám 325 nm až 435 nm, což rámcově souhlasí s absorpčním pásem I apigeninu.



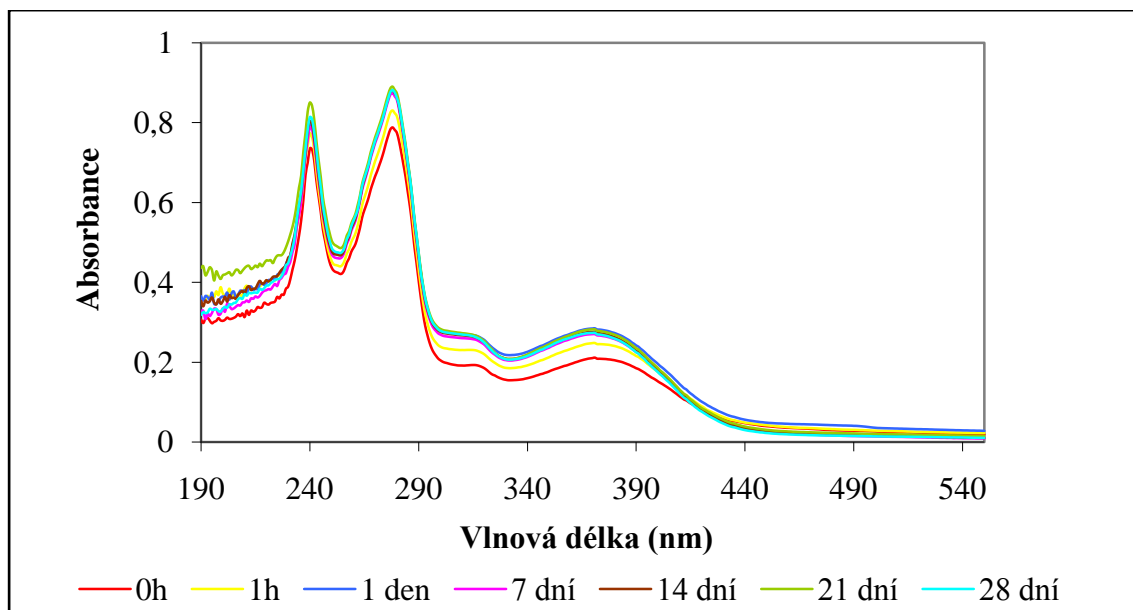
Obrázek č. 20: UV-VIS absorpční spektra interakce 16 μM HSA s 50 μM apigeninem (zásobní roztok v bezvodém MeOH) za fyziologických podmínek (37°C, pH 7,4).



Obrázek č. 21: UV-VIS absorpční spektra interakce 16  $\mu\text{M}$  HSA s 50  $\mu\text{M}$  apigeninem (zásobní roztok v 20 mM NaOH) za fyziologických podmínek (37°C, pH 7,4).



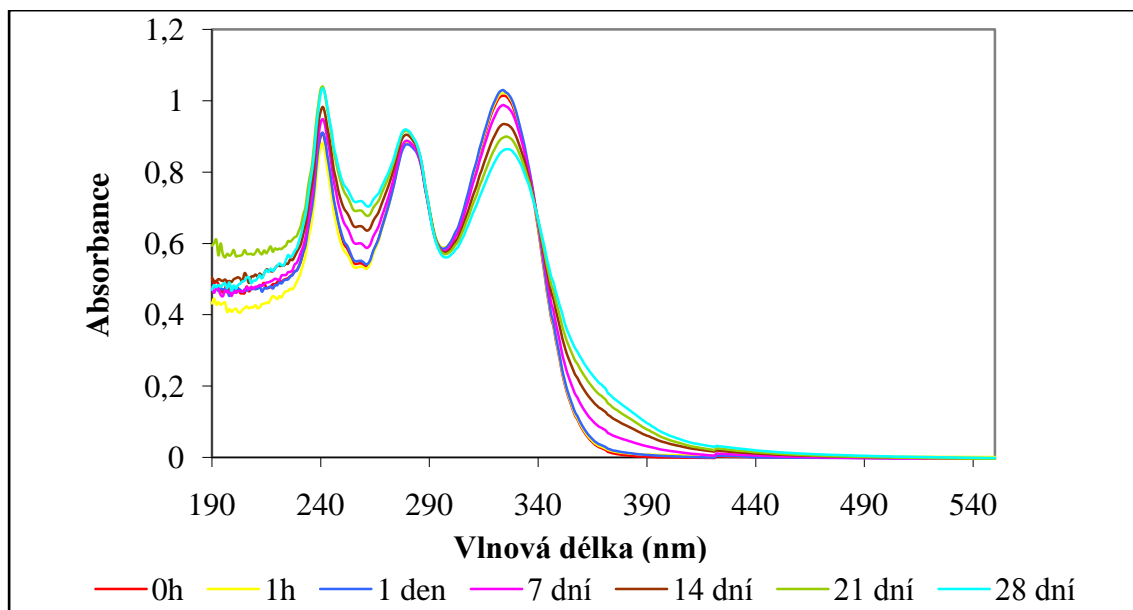
Obrázek č. 22: Rozdílová spektra 16  $\mu\text{M}$  HSA po interakci s 50  $\mu\text{M}$  apigeninem (zásobní roztok v bezvodém MeOH) za fyziologických podmínek (37°C, pH 7,4).



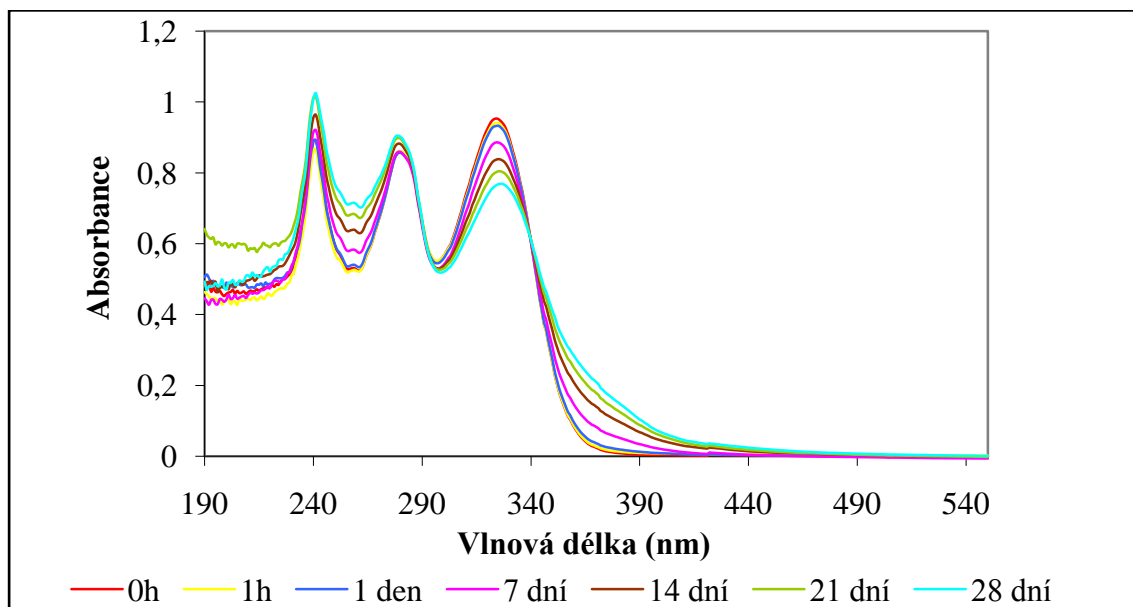
Obrázek č. 23: Rozdílová spektra 16  $\mu\text{M}$  HSA po interakci s 50  $\mu\text{M}$  apigeninem (zásobní roztok v 20 mM NaOH) za fyziologických podmínek (37°C, pH 7,4).

#### 5.2.1.3. Interakce HSA s naringeninem

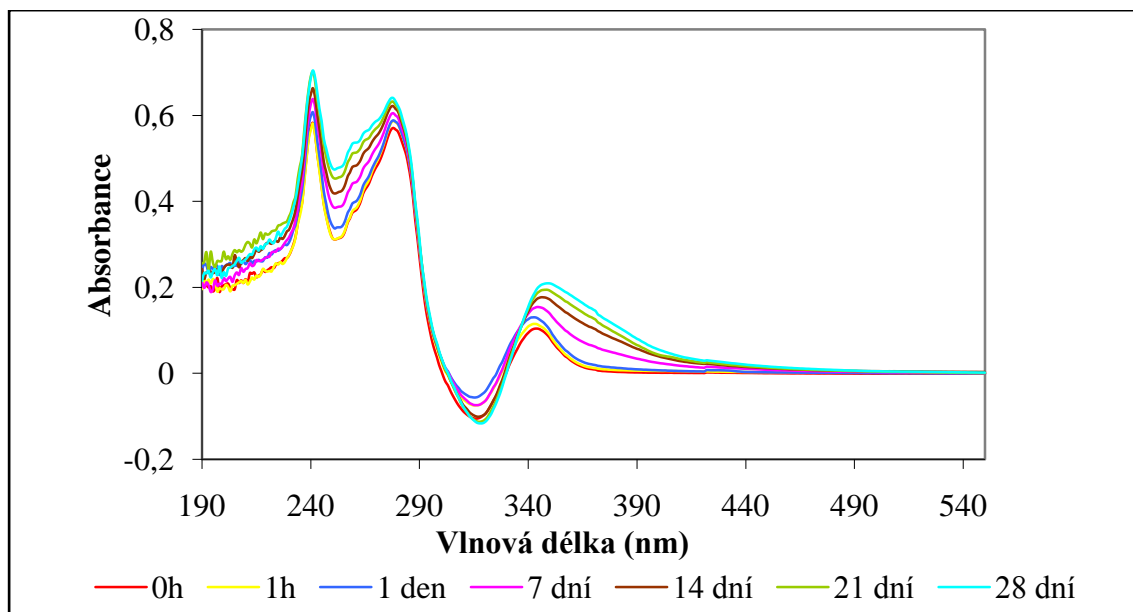
Absorpční spektra interakce HSA s naringeninem se lišila od absorpčních spekter samotné molekuly HSA. Absorbance se zvyšovala i snižovala, maxima se mírně posunula. Objevil se nový absorpční pás odpovídající vlnovým délkám 293 nm až 372 nm, což je pravděpodobně absorpční pás II naringeninu. Hodnoty absorbance nového pásu časem viditelně klesaly. Absorpční spektra HSA po interakci s naringeninem vykazovala v části křivky pokles absorbance k záporným hodnotám.



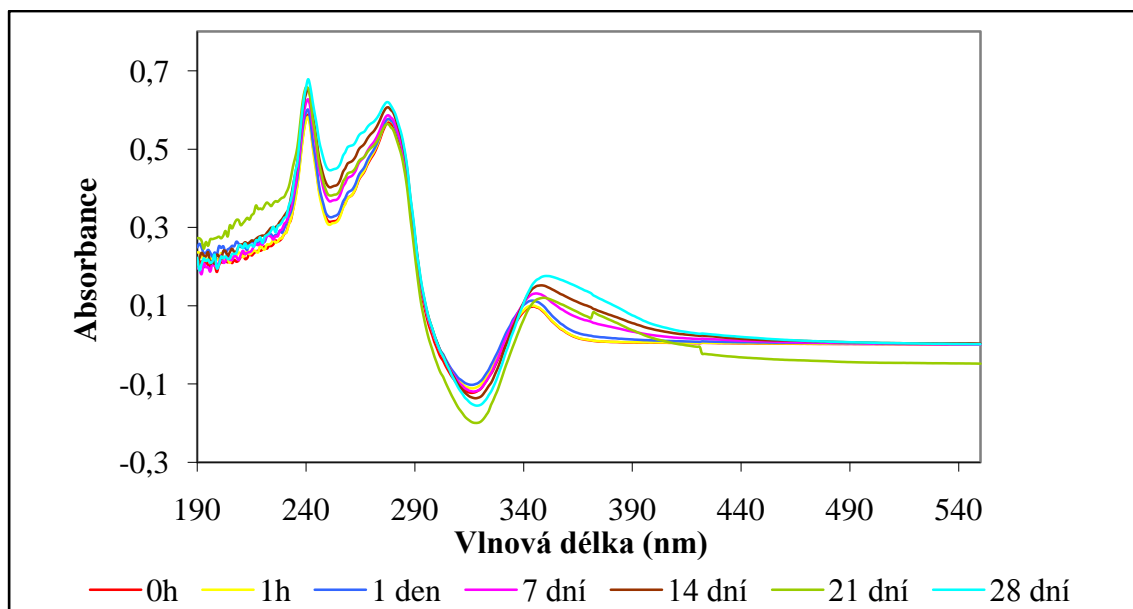
Obrázek č. 24: UV-VIS absorpční spektra interakce 16  $\mu\text{M}$  HSA s 50  $\mu\text{M}$  naringeninem (zásobní roztok v bezvodém MeOH) za fyziologických podmínek (37°C, pH 7,4).



Obrázek č. 25: UV-VIS absorpční spektra interakce 16  $\mu\text{M}$  HSA s 50  $\mu\text{M}$  naringeninem (zásobní roztok v 20 mM NaOH) za fyziologických podmínek (37°C, pH 7,4).



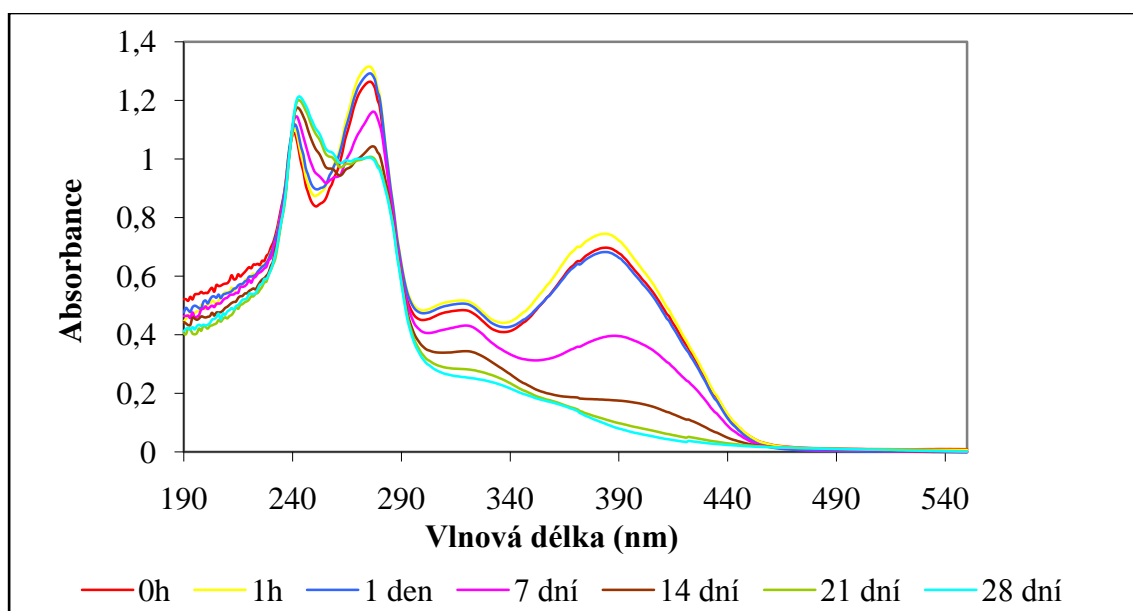
Obrázek č. 26: Rozdílová spektra 16  $\mu\text{M}$  HSA po interakci s 50  $\mu\text{M}$  naringeninem (zásobní roztok v bezvodém MeOH) za fyziologických podmínek (37°C, pH 7,4).



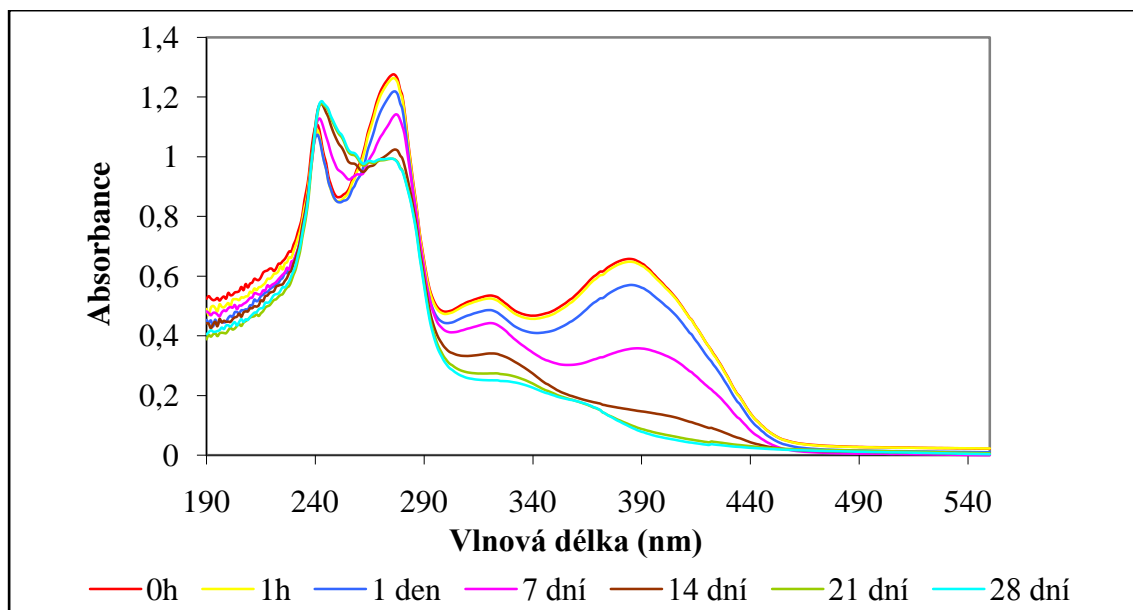
Obrázek č. 27: Rozdílová spektra 16  $\mu\text{M}$  HSA po interakci s 50  $\mu\text{M}$  naringeninem (zásobní roztok v 20 mM NaOH) za fyziologických podmínek (37°C, pH 7,4).

#### 5.2.1.4. Interakce HSA s kaempferolem

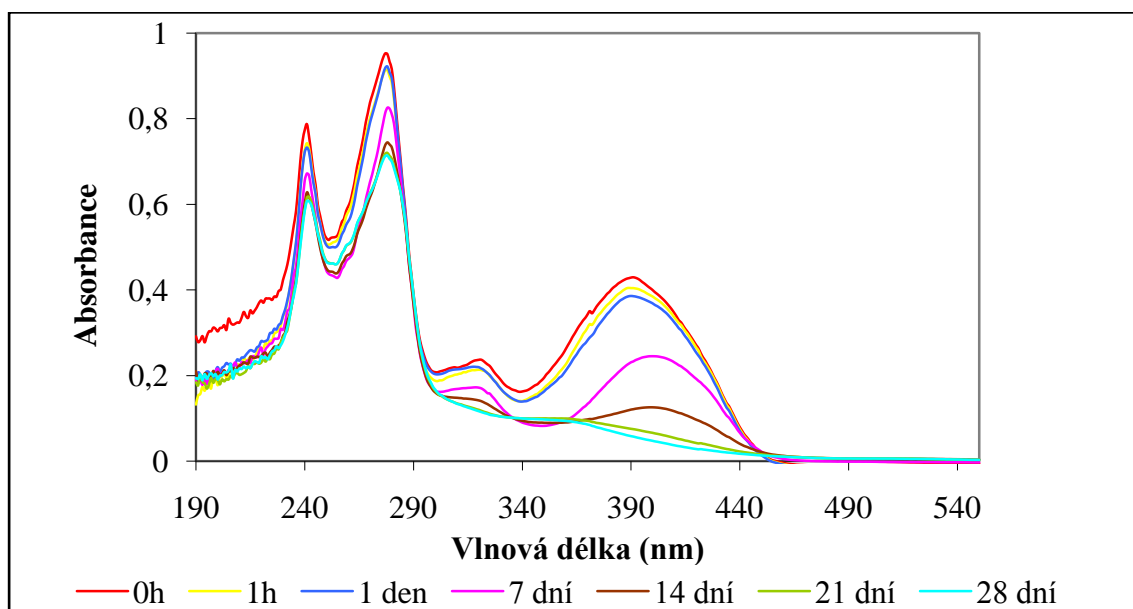
Absorpční spektra interakce HSA s kaempferolem a rozdílová spektra HSA po interakci s kaempferolem byla v porovnání s absorpčními spektry samotné molekuly HSA rozdílná. Absorbance se zvýšila, ale maxima (v čase 0 hodin) zůstala přibližně u stejných vlnových délek jako u samotné molekuly HSA (240 nm a 276 nm). Na křivkách se vyskytl nový absorpční pás odpovídající zhruba rozmezí vlnových délek 340 nm až 450 nm. Tento pás by mohl být absorpční pás I kaempferolu. U všech maxim absorbance byl časem patrný pokles a posun hodnot.



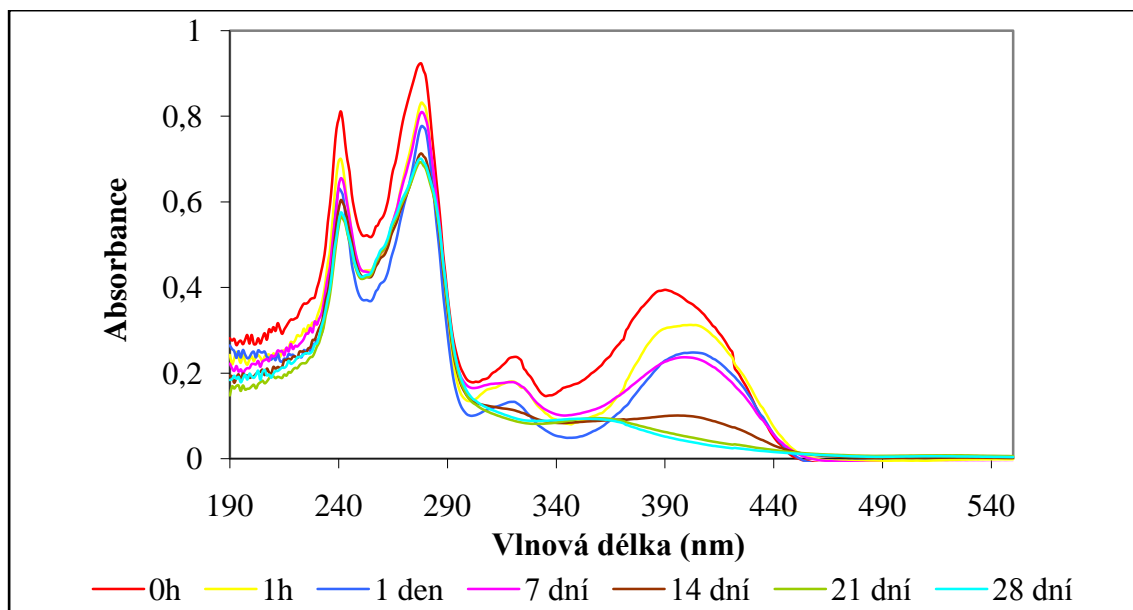
Obrázek č. 28: UV-VIS absorpční spektra interakce 16 μM HSA s 50 μM kaempferolem (zásobní roztok v bezvodém MeOH) za fyziologických podmínek (37°C, pH 7,4).



Obrázek č. 29: UV-VIS absorpční spektra interakce 16  $\mu\text{M}$  HSA s 50  $\mu\text{M}$  kaempferolem (zásobní roztok v 20 mM NaOH) za fyziologických podmínek (37°C, pH 7,4).



Obrázek č. 30: Rozdílová spektra 16  $\mu\text{M}$  HSA po interakci s 50  $\mu\text{M}$  kaempferolem (zásobní roztok v bezvodém MeOH) za fyziologických podmínek (37°C, pH 7,4).



Obrázek č. 31: Rozdílová spektra 16  $\mu\text{M}$  HSA po interakci s 50  $\mu\text{M}$  kaempferolem (zásobní roztok v 20 mM NaOH) za fyziologických podmínek (37°C, pH 7,4).

### 5.2.2. Sledování interakce antioxidantů s molekulou HSA pomocí fluorescenční spektroskopie (metoda zhášení tryptofanové fluorescence) za fyziologických podmínek (37°C, pH 7,4)

Druhou metodou, kterou jsem použila ke sledování interakce vybraných přírodních antioxidantů s molekulou HSA, byla fluorescenční spektroskopie (metoda zhášení tryptofanové fluorescence). Měření jsem prováděla na luminiscenční spektrofotometru Perkin-Elmer LS 50B při excitační vlnové délce, která odpovídá fluorescenci aromatické aminokyseliny tryptofanu, tj. 295 nm (Lakowicz 1999). Emisní spektra jsem zaznamenávala v rozsahu vlnových délek 290 - 540 nm. Excitační i emisní štěrbinu jsem nastavila na 5 nm a skenování probíhalo rychlostí 200 nm/minutu. K přípravě zásobních roztoků antioxidantů jsem použila bezvodý MeOH jako rozpouštědlo. Při experimentu byly navozeny fyziologické podmínky (teplota 37°C, pH 7,4).

Získaná data jsem vyhodnotila Stern-Volmerovou analýzou. Sestrojila jsem Stern-Volmerův diagram zhášení fluorescence tryptofanu v molekule HSA, který je vyjádřen jako závislost poměru  $F_0/F$  na koncentraci antioxidantu. V další analýze jsem vycházela z lineární části křivky (první čtyři přídavky antioxidantu). Vypočítala jsem dynamickou zhášecí konstantu  $K_{sv}$  a bimolekulární zhášecí konstantu  $K_q$ . Vytvořila jsem logaritmický

Stern-Volmerův diagram zhášení fluorescence tryptofanu v molekule HSA a stanovila vazebnou konstantu  $K_a$  a počet vazebných míst  $n$ . Z naměřených dat jsem také sestrojila grafy závislosti intenzity fluorescence na emisní vlnové délce. Tyto grafy znázorňují průběh fluorimetrické titrace HSA příslušným antioxidantem. Z naměřených hodnot jsem stanovila zhášecí podíl  $Q$  a na závěr jsem vypočítala změnu Gibbsovy energie  $\Delta G$ .

Rovnice, které jsem použila k výpočtu jednotlivých hodnot:

$$F_0/F = 1 + K_q\tau_0c = 1 + K_{sv}c$$

kde  $F_0$  [AU] je intenzita fluorescence samotné molekuly,  $F$  [AU] je intenzita fluorescence v přítomnosti zhášedla,  $c$  [mol/l] je koncentrace zhášedla,  $K_q$  [l/mol/s] je bimolekulární zhášecí konstanta,  $K_{sv}$  [l/mol] je dynamická zhášecí konstanta ( $K_{sv} = K_q\tau_0$ ) a  $\tau_0$  [s] je doba dohasínání fluorescence bez přítomnosti zhášedla ( $10^{-8}$  s) (Yuan a kol., 2007).

$$\log \frac{(F_0-F)}{F} = \lg K_a + n \log c$$

kde  $F_0$  [AU] je intenzita fluorescence samotné molekuly,  $F$  [AU] je intenzita fluorescence v přítomnosti zhášedla,  $c$  [mol/l] je koncentrace zhášedla,  $K_a$  [l/mol] je vazebná konstanta a  $n$  je počet vazebných míst (Min a kol., 2004).

$$\Delta G = -RT \ln K_a$$

kde  $R$  je molární plynová konstanta (8,314 J/K mol),  $T$  je teplota [K] a  $K_a$  je vazebná konstanta [l/mol] (Lázníčková a Kubíček, 2001).

$$Q = (F_0 - F) / F_0$$

kde  $F_0$  [AU] je intenzita fluorescence samotné molekuly a  $F$  [AU] je intenzita fluorescence v přítomnosti zhášedla (Min a kol., 2004).

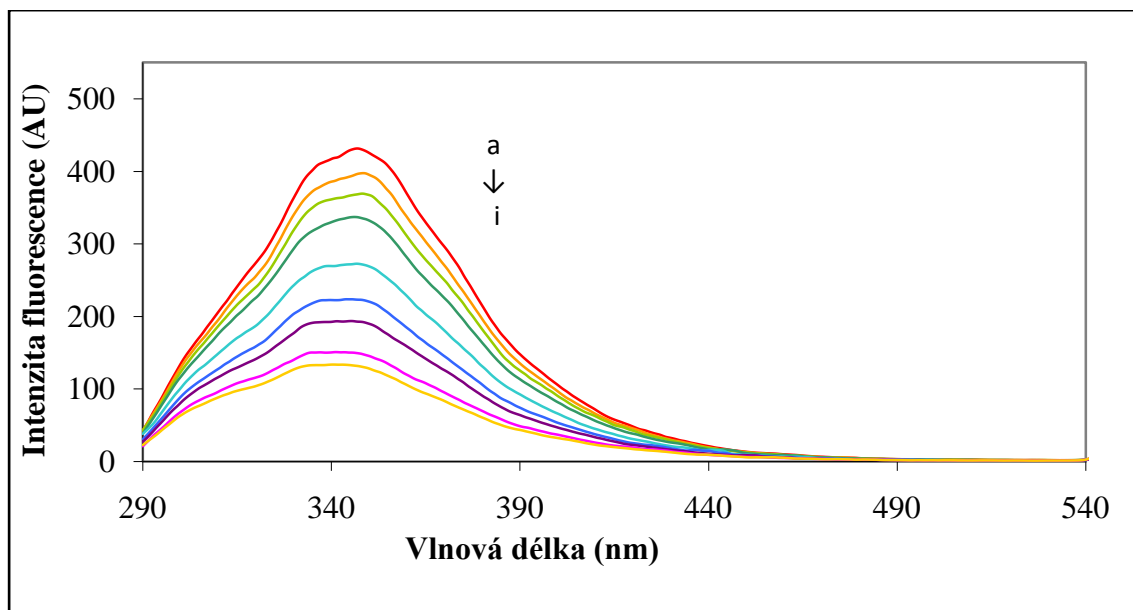
### 5.2.2.1. Interakce HSA s apigeninem

#### Fluorimetrická titrace

Obrázek č. 35 znázorňuje zhášení fluorescence HSA způsobené apigeninem. Je patrné, že intenzita fluorescence HSA postupně klesala se vzrůstající koncentrací tohoto antioxidantu. Maximum fluorescence samotné molekuly HSA bylo při emisní vlnové délce 347 nm, maxima fluorescence HSA s přidavky apigeninu vykazovala nejdříve mírný posun vpravo (červený posun), poté se vzrůstající koncentrací apigeninu výraznější posun vlevo (modrý posun), viz tabulka č. 13.

Tabulka č. 13: Zhášecí podíl  $Q$  při rostoucích koncentracích apigeninu, vlnová délka maxima intenzity fluorescence v průběhu fluorimetrické titrace 4  $\mu$ M HSA apigeninem.

<b>c antioxidantu (<math>\mu</math>M)</b>	<b>c antioxidantu/c HSA</b>	<b>vlnová délka (nm) maxima intenzity fluorescence</b>	<b>Q (%)</b>
0,0	0,000	347,0	0,00
2,5	0,625	348,5	6,55
5,0	1,250	348,0	11,69
7,5	1,875	347,0	18,25
10,0	2,500	347,0	27,32
12,5	3,125	345,5	37,87
15,0	3,750	345,5	47,97
17,5	4,375	341,0	54,14
20,0	5,000	340,5	60,41



Obrázek č. 35: Fluorescenční emisní spektra 4  $\mu\text{M}$  HSA s rostoucí koncentrací apigeninu za fyziologických podmínek ( $37^\circ\text{C}$ , pH 7,4) : (a) 0  $\mu\text{M}$ , (b) 2,5  $\mu\text{M}$ , (c) 5,0  $\mu\text{M}$ , (d) 7,5  $\mu\text{M}$ , (e) 10,0  $\mu\text{M}$ , (f) 12,5  $\mu\text{M}$ , (g) 15,0  $\mu\text{M}$ , (h) 17,5  $\mu\text{M}$ , (i) 20,0  $\mu\text{M}$ .

#### Stern-Volmerova analýza

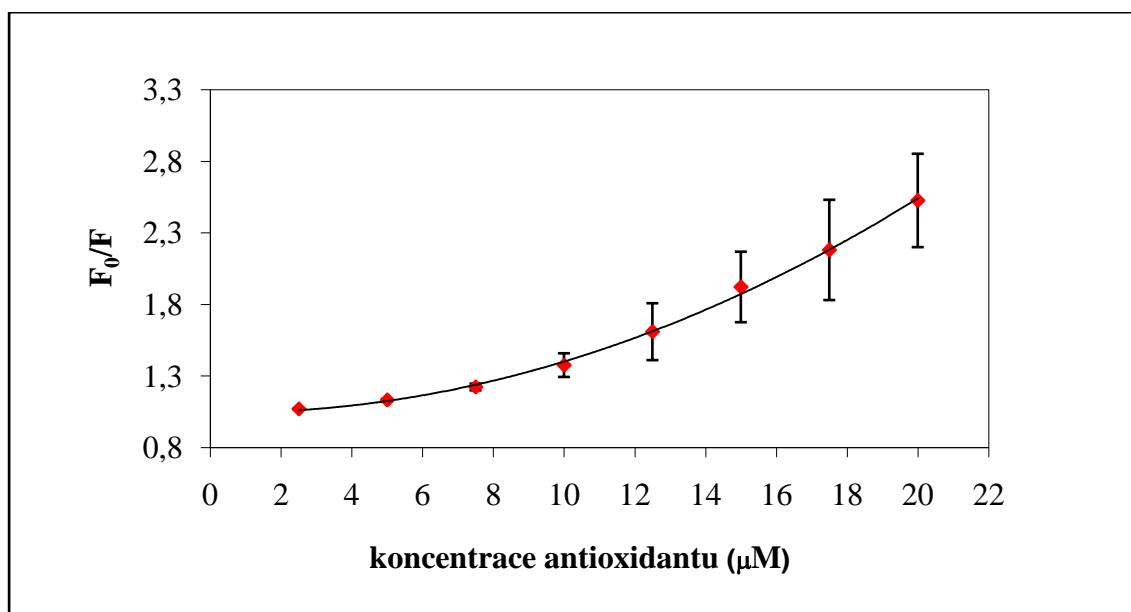
Z obrázku č. 32 vyplývá, že závislost poměru  $F_0/F$  na koncentraci apigeninu byla exponenciální, což naznačuje, že se jednalo o smíšené zhášení fluorescence. Pro Stern-Volmerovu analýzu jsem zvolila první lineární část použitého rozsahu koncentrací. Z rovnice počáteční lineární části (viz obrázek č. 33) jsem vypočítala dynamickou zhášecí konstantu  $K_{sv} = 4,03 \times 10^4 \text{ l/mol}$  a bimolární zhášecí konstantu  $K_q = 4,03 \times 10^{12} \text{ l/mol/s}$  ( $K_q = K_{sv}/\tau_0$ ;  $\tau_0 = 10^{-8} \text{ s}$ ). Vzhledem k tomu, že bimolekulární zhášecí konstanta  $K_q$  pro systém HSA-apigenin byla větší než limitní difuzní konstanta  $K_{dif}$  ( $K_{dif} = 2,0 \times 10^{10} \text{ l/mol/s}$ ), hlavním mechanismem zhášení fluorescence bylo zhášení statické. Z rovnice logaritmického Stern-Volmerova diagramu (obrázek č. 34) jsem ze zmíněného lineárního úseku křivky získala vazebnou konstantu  $K_a = 1,84 \times 10^4 \text{ l/mol}$  a ze směrnice přímky počet vazebných míst  $n = 1,03$ . Změna Gibbsovy energie  $\Delta G$  byla  $-25,404 \text{ kJ/mol}$ .

Tabulka č. 11: Data pro sestavení obrázku č. 32 a č. 33.

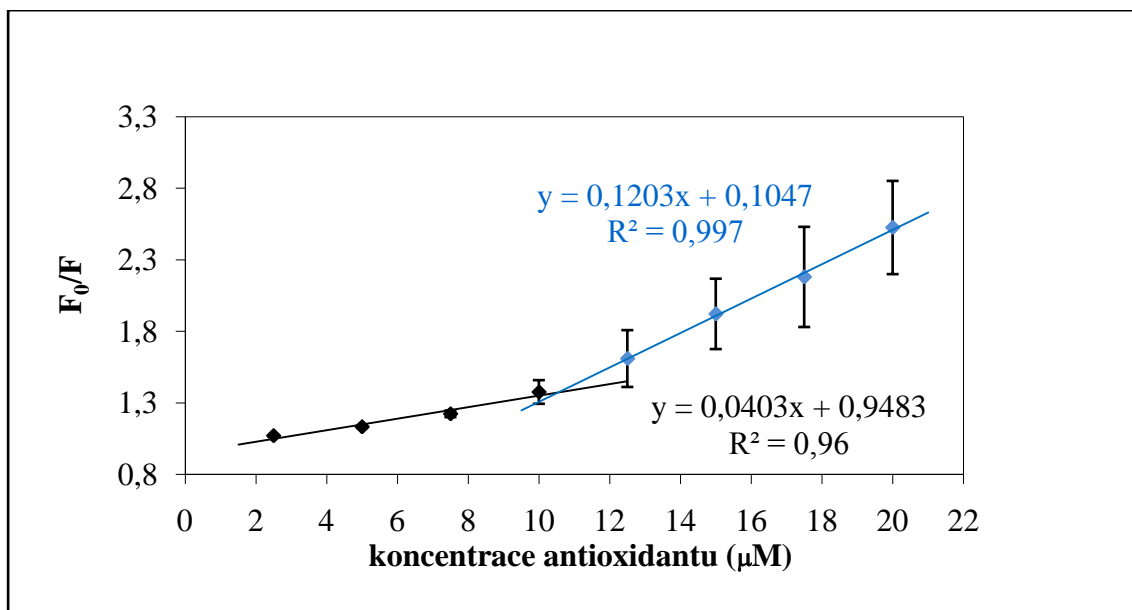
c antioxidantu (μM)	F	F <sub>0</sub> /F
0,0	440,695 (=F <sub>0</sub> )	1,000
2,5	411,830	1,070
5,0	389,180	1,132
7,5	360,290	1,223
10,0	320,280	1,376
12,5	273,795	1,610
15,0	229,315	1,922
17,5	202,120	2,180
20,0	174,480	2,526

Tabulka č. 12: Data pro sestavení obrázku č. 34.

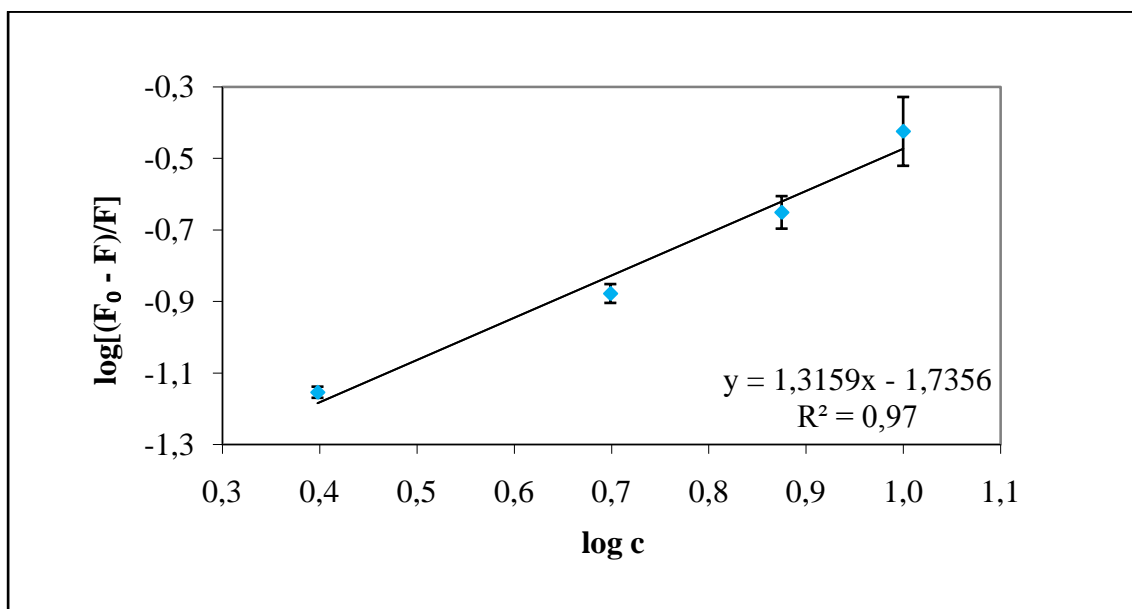
log[(F <sub>0</sub> - F)/F]	log c antioxidantu (μM)
-1,154	0,398
-0,878	0,699
-0,651	0,875
-0,425	1,000



Obrázek č. 32: Stern-Volmerův diagram zhasnutí fluorescence tryptofanu v molekule HSA (4 μM) s rostoucí koncentrací apigeninu (2,5 - 20,0 μM) za fyziologických podmínek (37°C, pH 7,4).



Obrázek č. 33: Stern-Volmerův diagram zhášení fluorescence tryptofanu v molekule HSA (4  $\mu\text{M}$ ) s rostoucí koncentrací apigeninu (2,5 - 20,0  $\mu\text{M}$ ) za fyziologických podmínek (37°C, pH 7,4) rozdělený na 2 lineární části.



Obrázek č. 34: Logaritmičský Stern-Volmerův diagram zhášení fluorescence tryptofanu v molekule HSA (4  $\mu\text{M}$ ) s rostoucí koncentrací apigeninu (2,5 - 10  $\mu\text{M}$ ) za fyziologických podmínek (37°C, pH 7,4).

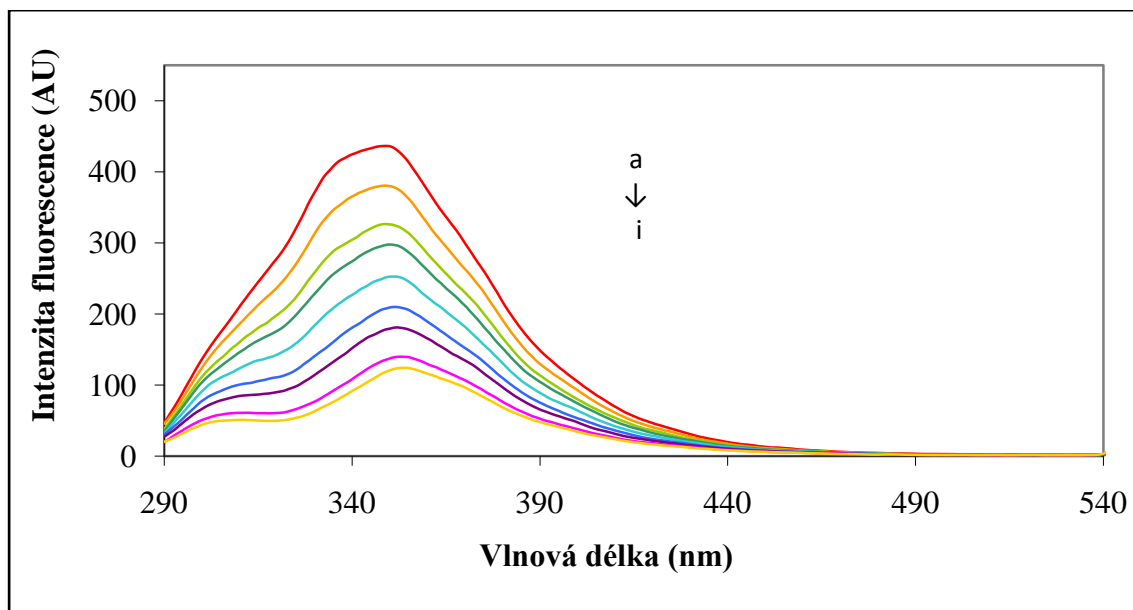
#### 5.2.2.2. Interakce HSA s naringeninem

##### Fluorimetrická titrace

Zhášení fluorescence tryptofanu v molekule HSA prostřednictvím naringeninu je zobrazeno na obrázku č. 39. Z grafu lze vyčíst, že fluorescence HSA postupně klesala s rostoucí koncentrací naringeninu. Maximum fluorescence samotné molekuly HSA odpovídalo emisní vlnové délce 349 nm, maxima fluorescence HSA s přísávkou naringeninu se viditelně posunula vpravo (červený posun), viz tabulka č. 16.

Tabulka č. 16: Zhášecí podíl  $Q$  při rostoucích koncentracích naringeninu, vlnová délka maxima intenzity fluorescence při fluorimetrické titraci 4  $\mu\text{M}$  HSA naringeninem.

<b>c antioxidantu (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>c antioxidantu/c HSA</b>	<b>vlnová délka (nm) maxima intenzity fluorescence</b>	<b>Q (%)</b>
0,0	0,000	349,0	0,00
2,5	0,625	349,0	12,94
5,0	1,250	349,0	26,44
7,5	1,875	350,0	34,54
10,0	2,500	351,0	45,55
12,5	3,125	351,5	54,76
15,0	3,750	352,0	62,69
17,5	4,375	353,0	73,01
20,0	5,000	354,0	76,29



Obrázek č. 39: Fluorescenční emisní spektra 4  $\mu\text{M}$  HSA s rostoucí koncentrací naringeninu za fyziologických podmínek (37°C, pH 7,4) : (a) 0  $\mu\text{M}$ , (b) 2,5  $\mu\text{M}$ , (c) 5,0  $\mu\text{M}$ , (d) 7,5  $\mu\text{M}$ , (e) 10,0  $\mu\text{M}$ , (f) 12,5  $\mu\text{M}$ , (g) 15,0  $\mu\text{M}$ , (h) 17,5  $\mu\text{M}$ , (i) 20,0  $\mu\text{M}$ .

#### Stern-Volmerova analýza

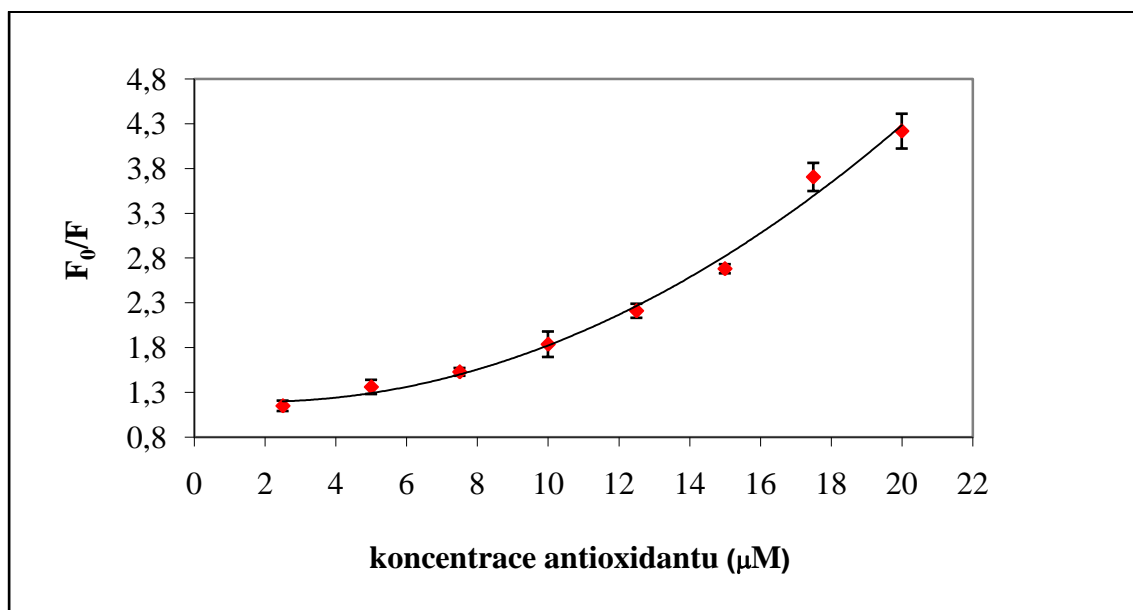
Závislost poměru  $F_0/F$  na koncentraci naringeninu byla exponenciální (viz obrázek č. 36), což znamená, že se jednalo o smíšené zhášení fluorescence. Pro Stern-Volmerovu analýzu jsem zvolila první lineární část použitého rozsahu koncentrací. Z rovnice přímky pro počáteční lineární část (viz obrázek č. 37) jsem získala dynamickou zhášecí konstantu  $K_{sv} = 8,93 \times 10^4 \text{ l/mol}$  a bimolekulární zhášecí konstantu  $K_q = 8,93 \times 10^{12} \text{ l/mol/s}$  ( $K_q = K_{sv}/\tau_0$ ;  $\tau_0 = 10^{-8} \text{ s}$ ). Vzhledem k tomu, že bimolekulární zhášecí konstanta  $K_q$  pro systém HSA-naringenin byla větší než limitní difuzní konstanta  $K_{dif}$  ( $K_{dif} = 2,0 \times 10^{10} \text{ l/mol/s}$ ), hlavním mechanismem zhášení fluorescence bylo zhášení statické. Z rovnice logaritmického Stern-Volmerova diagramu (viz obrázek č. 38) jsem z lineárního úseku křivky získala vazebnou konstantu  $K_a = 1,79 \times 10^4 \text{ l/mol}$  a ze směrnice přímky počet vazebných míst  $n = 1,27$ . Změna Gibbsovy energie  $\Delta G$  byla - 25,332 kJ/mol.

Tabulka č. 14: Data pro sestavení obrázku č. 36  
a č. 37.

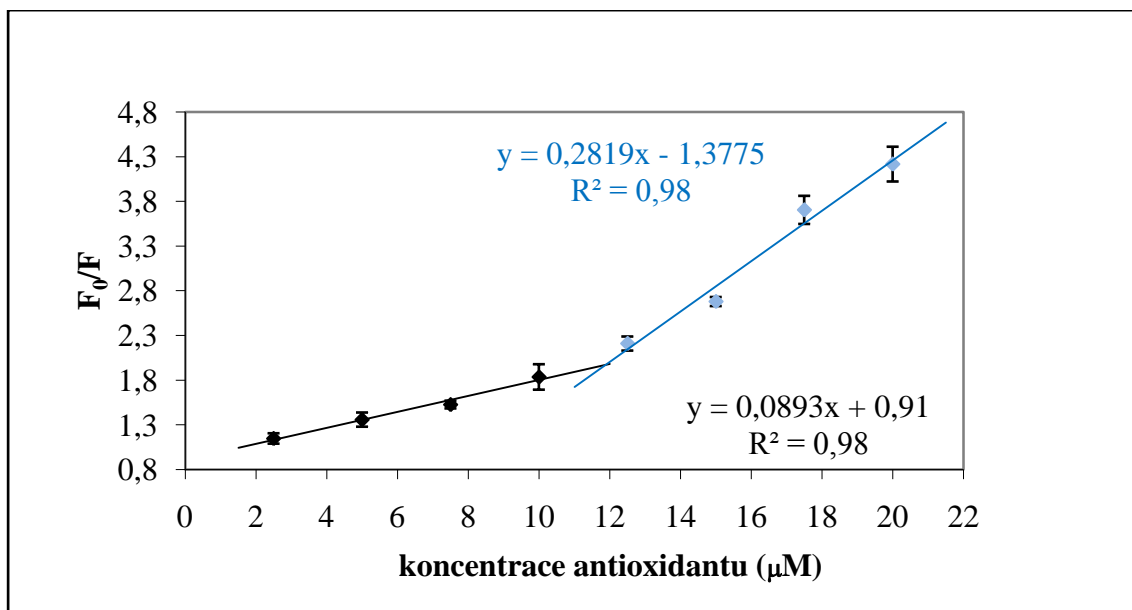
c antioxidantu (μM)	F	F <sub>0</sub> /F
0,0	430,470 (=F <sub>0</sub> )	1,000
2,5	374,780	1,149
5,0	316,660	1,359
7,5	281,765	1,528
10,0	234,395	1,837
12,5	194,760	2,210
15,0	160,620	2,680
17,5	116,175	3,705
20,0	102,064	4,218

Tabulka č. 15: Data pro sestavení obrázku  
č. 38.

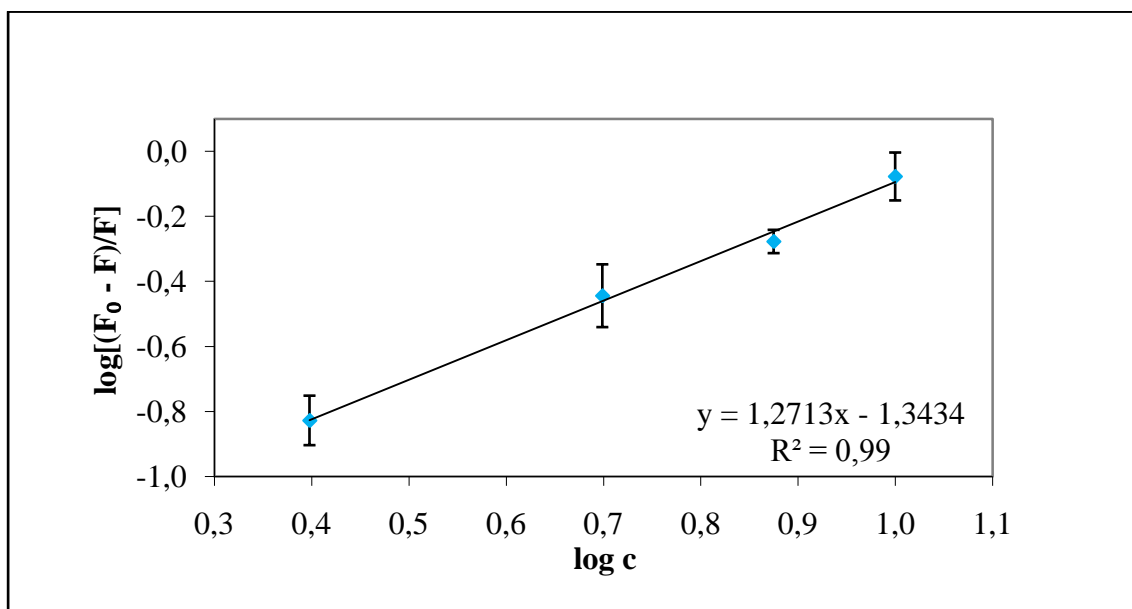
log[(F <sub>0</sub> - F)/F]	log c antioxidantu (μM)
-0,8280	0,398
-0,4444	0,699
-0,2776	0,875
-0,0775	1,000



Obrázek č. 36: Stern-Volmerův diagram zhasnutí fluorescence tryptofanu v molekule HSA (4 μM) s rostoucí koncentrací naringenin (2,5 - 20,0 μM) za fyziologických podmínek (37°C, pH 7,4).



Obrázek č. 37: Stern-Volmerův diagram zhášení fluorescence tryptofanu v molekule HSA (4 μM) s rostoucí koncentrací naringeninu (2,5 - 20,0 μM) za fyziologických podmínek (37°C, pH 7,4), rozdělený na 2 lineární části.



Obrázek č. 38: Logaritmický Stern-Volmerův diagram zhášení fluorescence tryptofanu v molekule HSA (4 μM) s rostoucí koncentrací naringeninu (2,5 - 10 μM) za fyziologických podmínek (37°C, pH 7,4).

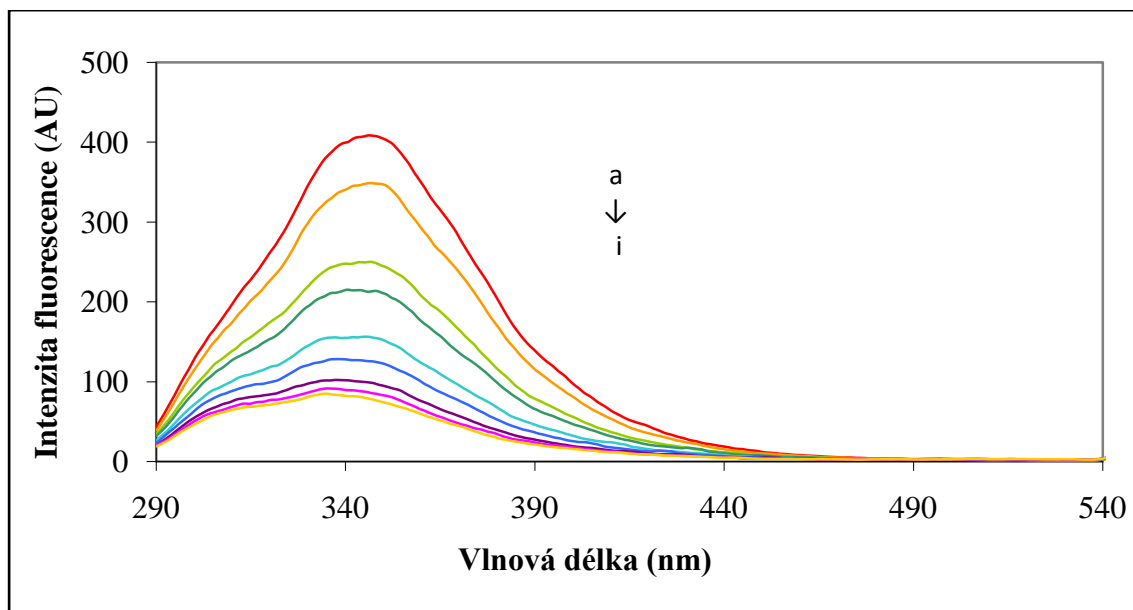
### 5.2.2.3. Interakce HSA s kaempferolem

#### Fluorimetrická titrace

Při fluorimetrické titraci molekuly HSA kaempferolem docházelo ke zhášení fluorescence tryptofanu v HSA. Se vzrůstající koncentrací kaempferolu se postupně snižovala intenzita fluorescence (viz obrázek č. 43). Maximum intenzity fluorescence samotné molekuly HSA bylo 346,5 nm a toto maximum se s přidavkem kaempferolu výrazně posunulo vlevo (modrý posun), viz tabulka č. 19.

Tabulka č. 19: Zhášecí podíl  $Q$  při rostoucích koncentracích kaempferolu, vlnová délka maxima intenzity fluorescence při fluorimetrické titraci 4  $\mu\text{M}$  HSA kaempferolem.

<b>c antioxidantu (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>c antioxidantu/c HSA</b>	<b>vlnová délka (nm) maxima intenzity fluorescence</b>	<b>Q (%)</b>
0,0	0,000	346,5	0,00
2,5	0,625	346,5	17,87
5,0	1,250	346,5	44,24
7,5	1,875	347,0	55,39
10,0	2,500	346,5	66,57
12,5	3,125	343,0	74,31
15,0	3,750	339,0	79,44
17,5	4,375	335,5	82,23
20,0	5,000	334,5	84,33



Obrázek č. 43: Fluorescenční emisní spektra 4  $\mu\text{M}$  HSA s rostoucí koncentrací kaempferolu za fyziologických podmínek ( $37^\circ\text{C}$ , pH 7,4) : (a) 0  $\mu\text{M}$ , (b) 2,5  $\mu\text{M}$ , (c) 5,0  $\mu\text{M}$ , (d) 7,5  $\mu\text{M}$ , (e) 10,0  $\mu\text{M}$ , (f) 12,5  $\mu\text{M}$ , (g) 15,0  $\mu\text{M}$ , (h) 17,5  $\mu\text{M}$ , (i) 20,0  $\mu\text{M}$ .

#### Stern-Volmerova analýza

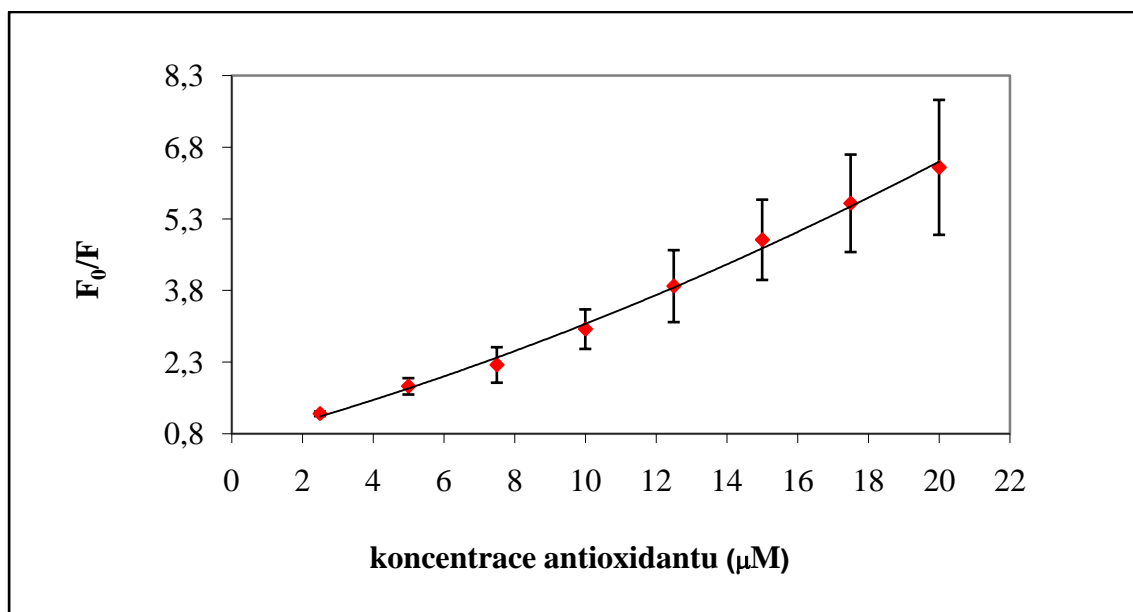
Na obrázku č. 40 lze vidět, že závislost poměru  $F_0/F$  na koncentraci kaempferolu byla téměř lineární, což znamená, že zhášení fluorescence bylo dynamické nebo statické. Pro Stern-Volmerovu analýzu jsem zvolila první lineární část použitého rozsahu koncentrací (stejně jako u ostatních studovaných látek). Z rovnice počáteční části grafu (viz obrázek č. 41) jsem vypočítala dynamickou zhášecí konstantu  $K_{sv} = 2,31 \times 10^5 \text{ l/mol}$  a bimolekulární zhášecí konstantu  $K_q = 2,31 \times 10^{13} \text{ l/mol/s}$  ( $K_q = K_{sv}/\tau_0$ ;  $\tau_0 = 10^{-8} \text{ s}$ ). Vzhledem k tomu, že bimolární zhášecí konstanta  $K_q$  byla větší než limitní difuzní konstanta  $K_{dif}$  ( $K_{dif} = 2,0 \times 10^{10} \text{ l/mol/s}$ ), jednalo se pravděpodobně o statické zhášení. Z rovnice logaritmického Stern-Volmerova diagramu (viz obrázek č. 43) jsem z lineárního úseku křivky získala vazebnou konstantu  $K_a = 5,48 \times 10^4 \text{ l/mol}$  a ze směrnice přímky počet vazebných míst  $n = 1,57$ . Změna Gibbsovy energie  $\Delta G$  byla - 28,227 kJ/mol.

Tabulka č. 17: Data pro sestavení obrázku č. 40 a č. 41.

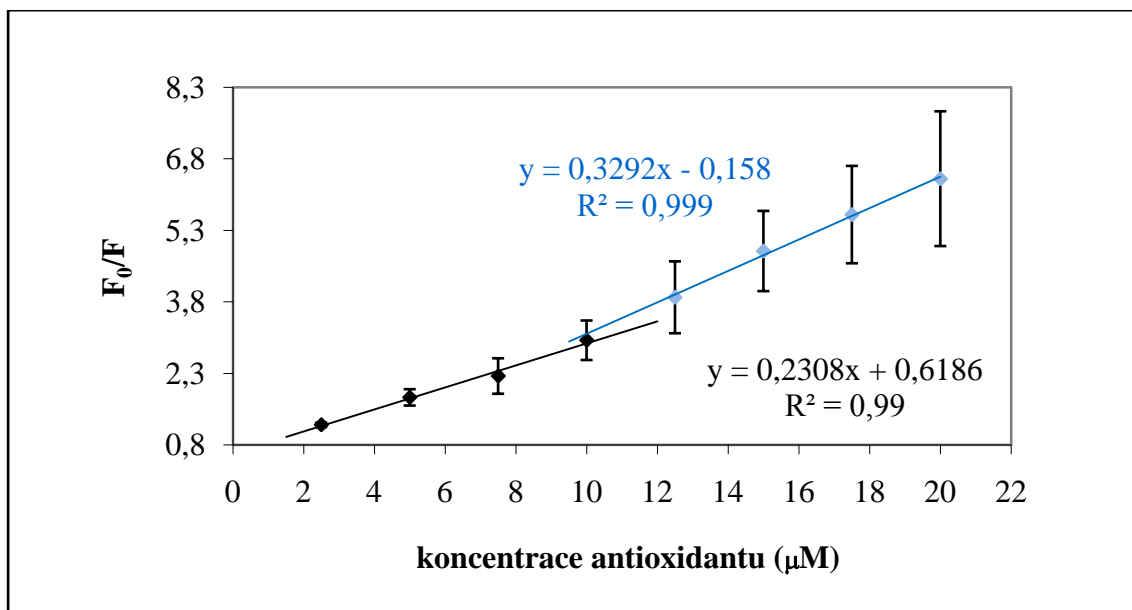
c antioxidantu (μM)	F	F <sub>0</sub> /F
0,0	421,720 (=F <sub>0</sub> )	1,000
2,5	346,355	1,218
5,0	235,14	1,793
7,5	188,15	2,241
10,0	140,975	2,991
12,5	108,342	3,893
15,0	86,713	4,863
17,5	74,934	5,628
20,0	66,092	6,381

Tabulka č. 18: Data pro sestavení obrázku č. 42.

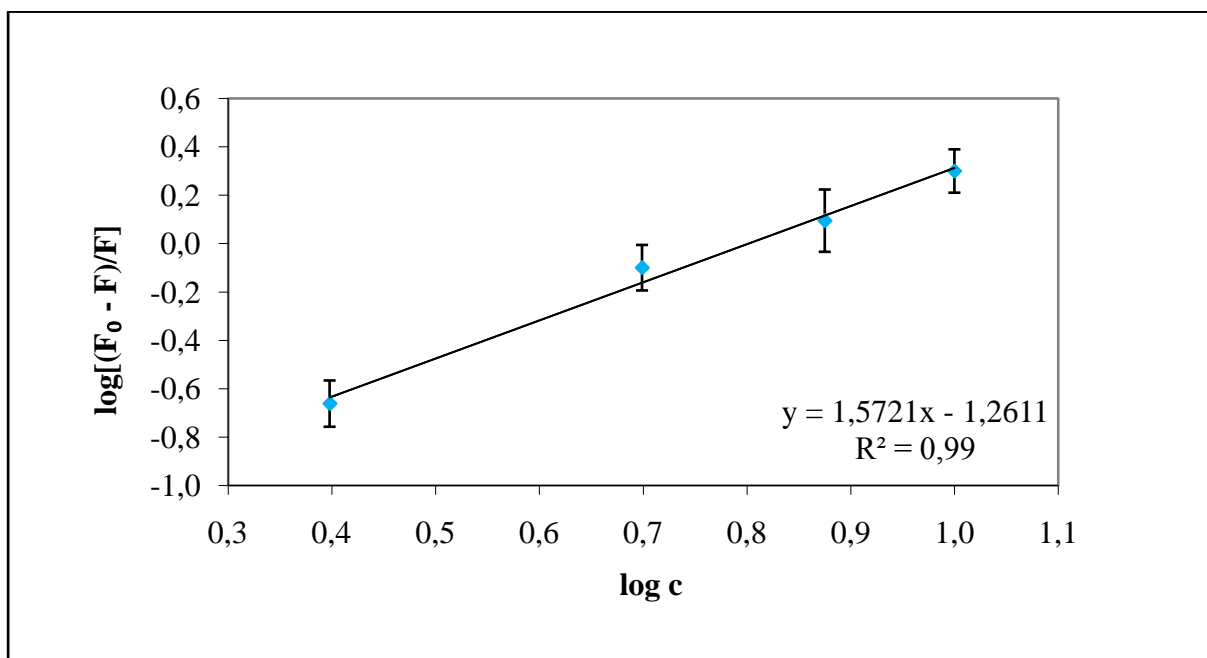
lg[(F <sub>0</sub> - F)/F]	lg c antioxidantu (μM)
-0,662	0,398
-0,100	0,699
0,094	0,875
0,299	1,000



Obrázek č. 40: Stern-Volmerův diagram zhášení fluorescence tryptofanu v molekule HSA (4 μM) s rostoucí koncentrací kaempferolu (2,5 - 20,0 μM) za fyziologických podmínek (37°C, pH 7,4).



Obrázek č. 41: Stern-Volmerův diagram zhášení fluorescence tryptofanu v molekule HSA (4  $\mu\text{M}$ ) s rostoucí koncentrací kaempferolu (2,5 - 20,0  $\mu\text{M}$ ) za fyziologických podmínek (37°C, pH 7,4), rozdělený na 2 lineární části.



Obrázek č. 42: Logaritmický Stern-Volmerův diagram zhášení fluorescence tryptofanu v molekule HSA (4  $\mu\text{M}$ ) s rostoucí koncentrací kaempferolu (2,5 - 10  $\mu\text{M}$ ) za fyziologických podmínek (37°C, pH 7,4).

## 6. DISKUZE

Flavonoidy jsou přirozenou součástí potravy. Vyskytují se zejména v ovoci, zelenině a v některých nápojích (zelený čaj, víno). Podobně jako všechny exogenní látky, které vstupují do těla, mohou i flavonoidy reagovat s celou řadou biomolekul včetně proteinů. Potenciální vazba flavonoidů na bílkoviny může ovlivnit přirozenou funkci těchto bílkovin v organismu, nebo být zdrojem interakcí s látkami, které vykazují k těmto bílkovinám afinitu. Lidský sérový albumin je nejhojněji zastoupený protein krevní plasmy a je proto ideální pro studium interakcí s flavonoidy.

Při prvním experimentu jsem se pomocí UV-VIS absorpční spektroskopie snažila sledovat stabilitu vybraných přírodních antioxidantů (apigenin, naringenin, kaempferol) v čase za fyziologických podmínek (37°C, pH 7,4). Experiment probíhal 28 dní a jednotlivé vzorky jsem měřila v intervalech 0, 1 hodina, 1 den, 7 dní, 14 dní, 21 dní a 28 dní. Princip této metody spočívá v tom, že každá zadaná látka vykazovala v čerstvě připraveném roztoku určité charakteristické spektrum, které se časem více či méně měnilo. Z těchto změn lze odhadnout míru nestability daného antioxidantu. Pro přípravu zásobních roztoků antioxidantů jsem použila dvě rozpouštědla (bezvodý MeOH a 20 mM NaOH). Zjistila jsem, že vybrané antioxidanty se daleko snáze rozpouštěly v bezvodém MeOH. Negativní vliv na jejich rozpustnost v 20 mM NaOH má pravděpodobně poměrně vysoký podíl přítomné vody, ve které jsou tyto flavonoidy téměř nerozpustné.

Je známo, že většina flavonů (*apigenin*) a flavonolů (*kaempferol*) vykazuje v UV-VIS oblasti dva hlavní absorpční pásy. Pás I v rozmezí 320-385 nm reprezentuje kruh B a pás II v rozmezí 250-285 nm reprezentuje kruh A (Rice-Evans a kol., 1996). Oba tyto pásy jsem ve svých naměřených spektrech identifikovala, i když u pásu I došlo u obou antioxidantů k posunu horní vlnové délky směrem vpravo. K takovým změnám může snadno dojít vlivem rozdílných experimentálních podmínek nebo použitých chemikálií. V literatuře je také popsáno, že absence 3-OH skupiny u flavonů se projeví na absorpčním spektru tak, že se jejich pás I přesune ke kratším vlnovým délkám než u flavonolů (Rice-Evans a kol., 1996). Tento posun jsem v naměřeném absorpčním spektru apigeninu skutečně zaznamenala.

Flavanony, které jsou monosubstituované na kruhu B (*naringenin*), jsou charakteristické tím, že v UV-VIS spektru vykazují maximum pásu II přibližně při vlnové délce 270 nm. Pás I by se měl jevit jen jako raménko ve vlnové délce 326 nm (Rice-Evans a kol., 1996). V naměřeném spektru naringeninu bylo maximum pásu II již při 238 nm, což se

liší od hodnot, které jsou uvedeny v literatuře. Opět mohou hrát roli rozdílné experimentální podmínky nebo použité chemikálie. Pás I dosáhl maxima při 320 nm, což rámcově odpovídá publikaci Rice-Evansové a kol. (1996).

Ze zvolených antioxidantů se jako nejméně stabilní projevil kaempferol. Jeho UV-VIS spektra totiž v průběhu času vykazovala největší deformace. K nejvýraznějším změnám došlo v průběhu prvních 7 dnů. V časovém intervalu 14 až 28 dní byl ve spektrech kaempferolu patrný tzv. isosbestický bod, který naznačuje přítomnost rovnovážného systému. Pro bližší charakterizaci tohoto systému ale není zvolená metoda dostatečná. Apigenin a naringenin byly v průběhu tohoto experimentu stabilní.

Výsledky prvního experimentu prokázaly, že kaempferol je poměrně nestabilní antioxidant. Tím vznikl námět na druhou část stabilitní studie, ve které jsem se snažila najít vztah mezi stabilitou a teplotou uchovávání zásobních roztoků antioxidantů. Pro úplnost jsem do pokusu zahrnula i apigenin a naringenin, ačkoliv se v předešlém experimentu projevíly stabilně.

Pomocí UV-VIS absorpční spektroskopie jsem tedy sledovala stabilitu antioxidantů v závislosti na třech různých teplotách uchovávání (-20°C, 4°C, 25°C). Měření jsem provedla jednorázově po uplynutí 28 dní. Kaempferol se v bezvodém MeOH jevil za těchto teplot uchovávání na rozdíl od prvního experimentu (37°C) stabilně. Vliv teploty na stabilitu byl patrný u kaempferolu rozpuštěném v 20 mM NaOH. Zde se prokázalo, že při nejnižší teplotě (-20°C) je zásobní roztok této sloučeniny stabilní. Absorpční spektrum roztoku kaempferolu uchovávaného při -20°C bylo totiž v porovnání se spektrem čerstvého roztoku prakticky nezměněné, zatímco u zbylých dvou teplot došlo ve spektrech k posunům maxim absorpce. U apigeninu ani naringeninu neovlivnily použité teploty jejich stabilitu.

Přesto, že se antioxidačnímu potenciálu flavonoidů věnovalo již mnoho studií, o jejich chování *in vivo* je stále poměrně málo poznatků. Vzhledem k tomu, že vazba látek na plasmatické proteiny ovlivňuje jejich biodostupnost v organismu, je potenciální interakce flavonoidů s HSA důležitým farmakokinetickým parametrem těchto antioxidantů.

Interakci vybraných přírodních antioxidantů (apigenin, naringenin, kaempferol) jsem nejprve pozorovala pomocí UV-VIS absorpční spektroskopie za fyziologických podmínek (37°C, pH 7,4). K přípravě roztoků antioxidantů jsem použila opět obě rozpouštědla (bezvodý MeOH a 20 mM NaOH). Experiment probíhal 28 dní a intervaly měření byly 0, 1 hodina, 1 den, 7 dní, 14 dní, 21 dní a 28 dní.

Samotná molekula *HSA* se v průběhu 28 dní neměnila, což vyplynulo z totožných absorpčních spekter ve všech časových intervalech. Spektra *HSA* vykazovala dvě maxima. První maximum odpovídalo 240 nm (v pásu 225 až 248 nm), druhé bylo při 276 nm (v pásu 250 až 302 nm). Nejvýznamnějšími chromofory v molekule *HSA* jsou tryptofan (295 nm) a tyrosin (275 nm), minoritně přispívá fenylalanin (260 nm) (Švehlová, 2007). Je tedy pravděpodobné, že pás 250 až 302 nm v naměřeném spektru odpovídal tryptofanu, zatímco pásu 225 až 248 nm odpovídá tyrosin a fenylalanin.

Absorpční spektra interakce *HSA* s vybranými antioxidanty se od absorpčních spekter samotné molekuly *HSA* výrazně lišila. Změny, které při interakci ve spektrech nastaly, měly společné znaky u všech tří antioxidantů. Došlo ke zvýšení absorpance a ke vzniku nových absorpčních pásů, které vždy rámcově odpovídaly některému z pásů v absorpčním spektru samotného antioxidantu. Z této skutečnosti lze usuzovat, že docházelo k interakci mezi molekulou *HSA* a antioxidanty. V absorpčních spektrech interakce *HSA* s naringeninem se objevil isosbestický bod, který může znamenat přítomnost rovnovážného systému vázané a nevázané formy *HSA* s naringeninem.

Na všech výše uvedených absorpčních spektrech byly patrné fluktuace hodnot absorpance, což mohlo být způsobeno nedokonalým utěsněním vzorků parafilmem, příliš pomalou manipulací se vzorky, nebo nedokonalým vymytím/vysušením kyvety, atd.

Druhou metodou, kterou jsem použila ke sledování interakce vybraných přírodních antioxidantů s molekulou *HSA*, byla fluorescenční spektroskopie (metoda zhášení tryptofanové fluorescence). Tato metoda poskytuje informace o změnách v okolí fluoroforu, který se vyskytuje v dané molekule. Fluorescence *HSA* je způsobena přítomností 18 zbytků tyrosinu a 1 zbytku tryptofanu. Dominantní fluorescenci tryptofanu lze selektivně excitovat při excitačních vlnových délkách 295 až 305 nm (Fišar, 2004). Proto jsem měření prováděla při excitační vlnové délce 295 nm. Kvůli již výše zmíněné obtížné rozpustnosti vybraných antioxidantů v 20 mM NaOH jsem pro tento experiment jako rozpouštědlo zvolila pouze bezvodý MeOH.

Nejdříve jsem postupně provedla **fluorimetrické titrace** *HSA* zvolenými antioxidanty, které samy o sobě nemají schopnost fluorescence. Výsledky prokázaly, že intenzita fluorescence *HSA* postupně klesala se vzrůstající koncentrací těchto antioxidantů (docházelo ke zhášení fluorescence). Zhášení fluorescence může indikovat, že došlo k vazbě antioxidantů na *HSA*, což by zároveň znamenalo změnu terciární struktury *HSA* a změnu

prostředí v okolí tryptofanu (Min a kol., 2004). Při zhášení fluorescence *apigeninem* a *kaempferolem* docházelo k posunům vlnových délek vlevo (modrý posun), které jsou způsobeny snížením hydrofilicity v okolí tryptofanu v molekule HSA. Ke stejnému výsledku u kaempferolu dospěl i Xiao a kol. (2008), který se zabýval interakcí kaempferolu s BSA (hovězí sérový albumin). Při zhášení fluorescence *naringeninem* byl naopak viditelný posun vlnových délek vpravo (červený posun), který byl způsoben zvýšením hydrofilicity v okolí tryptofanu v molekule HSA. Tento výsledek je v rozporu s výsledkem studie Zhang a kol. (2008), který měl ovšem rozdílné experimentální podmínky (zejména nižší teplota, složení pufu, použité chemikálie).

Bližší informace o interakci HSA s antioxidanty poskytla následná **Stern-Volmerova analýza**. Závislost podílu intenzit fluorescence  $F_0/F$  na koncentraci *apigeninu* i *naringeninu* byla exponenciální, což znamená, že tyto antioxidanty zhášely tryptofanovou fluorescenci kombinovaným mechanismem (dynamicky i staticky). Závislost podílu intenzit fluorescence  $F_0/F$  na koncentraci *kaempferolu* byla téměř lineární, což naznačuje, že kaempferol zháší HSA buď staticky nebo dynamicky.

Pro další objasnění zhášecího mechanismu jsem u všech antioxidantů vycházela z počáteční lineární části Stern-Volmerova diagramu (koncentrace antioxidantů 2,5 až 10,0  $\mu\text{M}$ ). Sestrojila jsem logaritmický Stern-Volmerův diagram a vypočítala bimolekulární zhášecí konstantu  $K_q$ . Vzhledem k tomu, že tato konstanta byla u všech tří antioxidantů vyšší než limitní difuzní konstanta  $K_{dif}$ , bylo hlavním mechanismem zhášení fluorescence v daném rozsahu koncentrací zhášení statické.

Na základě tohoto zjištění jsem vypočítala vazebné parametry antioxidantů. Velikosti vazebných konstant  $K_a$  jednotlivých antioxidantů vyšly v klesajícím pořadí kaempferol > apigenin > naringenin. Největší vazebná konstanta  $K_a$  byla tedy zjištěna u kaempferolu. Při porovnání jeho struktury se strukturou apigeninu lze odvodit, že 3-OH skupina kaempferolu pravděpodobně vedla k výraznému zvýšení afinity tohoto antioxidantu k HSA. Porovnáním vazebné konstanty apigeninu a naringeninu lze analogicky dojít k závěru, že 2,3 nenasycený kruh C zřejmě mírně zvyšuje afinitu apigeninu k HSA. Pro nejvyšší afinitu k HSA se tedy v rámci vybraných antioxidantů zdá být nejvýhodnější kombinace 3-OH skupiny společně s 2,3 nenasyceným kruhem C v molekule kaempferolu, přičemž hlavní význam má pravděpodobně 3-OH skupina.

Vztahem mezi strukturou flavonoidů a velikostí vazebné konstanty se ve své práci zabýval například Xiao a kol. (2008), který zjišťoval, jakou roli hraje rozdílná hydroxylace kruhu B u vybraných flavonolů při jejich interakci s hovězím sérovým albuminem. Velikosti

vazebných konstant v jeho experimentu vyšly u zvolených zástupců v pořadí myricetin > kvercetin > kaempferol > galangin, což znamená, že afinita flavonolů k BSA rostla se zvyšujícím se počtem hydroxylových skupin na kruhu B.

Velikosti zhášecích konstant  $K_q$  jednotlivých antioxidantů vyšly v klesajícím pořadí kaempferol > naringenin > apigenin, což potvrzuje důležitost 3-OH skupiny kaempferolu při procesu zhášení.

Ze zhášecích podílů  $Q$  jednotlivých antioxidantů vyplynulo, že jejich schopnost měnit sekundární strukturu HSA klesá v pořadí kaempferol > naringenin > apigenin. Změna Gibbsovy energie  $\Delta G$  byla u všech zvolených antioxidantů menší než nula, což znamená, že k jejich vazbě na HSA docházelo spontánně.

## 7. SHRnutí

Apigenin i naringenin byly v průběhu čtyřtýdenního experimentu za fyziologických podmínek stabilní v obou rozpouštědlech (bezvodý MeOH, 20 mM NaOH). Kaempferol byl naopak v obou rozpouštědlech nestabilní, přičemž k největším změnám v jeho UV-VIS spektrech došlo v průběhu prvních sedmi dnů. Všechny zmíněné antioxidanty jsou vzhledem k vysokému obsahu vody v 20 mM NaOH v tomto rozpouštědle obtížně rozpustné.

Stabilita apigeninu a naringenu v obou rozpouštědlech nebyla ovlivněna rozdílnými teplotami uchovávání ( $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $25^{\circ}\text{C}$ ), oba zmíněné antioxidanty byly při všech teplotách stabilní. Kaempferol rozpuštěný v bezvodém MeOH se také při zmíněných teplotách choval stabilně. U kaempferolu, který byl rozpuštěný v 20 mM NaOH, se prokázalo, že pouze nejnižší teplota ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) uchovávání zajistí stabilitu tohoto roztoku.

Samotná molekula HSA byla v průběhu čtyřtýdenní inkubace ve fyziologických podmínkách stabilní. Na UV-VIS absorpčních spektrech interakce HSA s jednotlivými antioxidanty se objevily nové absorpční pásy, které vždy rámcově odpovídaly některému z pásů v absorpčním spektru samotného antioxidantu. Tato skutečnost poukazuje na pravděpodobnou interakci HSA s antioxidanty.

Fluorimetrická titrace HSA jednotlivými antioxidanty prokázala, že tyto antioxidanty zhasí tryptofanovou fluorescenci HSA. Fluorescence HSA klesala postupně se vzrůstající koncentrací všech antioxidantů. V emisních spektrech HSA docházelo v průběhu titrace k mírným posunům vlnových délek: u titrace apigeninem a kaempferolem vlevo (tj. došlo ke snížení hydrofility v okolí tryptofanu v molekule HSA), u titrace naringeninem vpravo (tj. zvýšení hydrofility v okolí tryptofanu v molekule HSA).

Z následné Stern-Volmerovy analýzy vyplynulo, že v rozsahu koncentrací antioxidantů 2,5 až 10  $\mu\text{M}$ , dochází u všech vybraných antioxidantů ke statickému typu zhasení, při kterém se po kontaktu fluoroforu a zhasedla vytváří nefluoreskující komplex. Velikosti vazebných konstant  $K_a$  jednotlivých antioxidantů klesaly v pořadí kaempferol > apigenin > naringenin. Porovnání vypočítaných vazebných konstant  $K_a$  antioxidantů v kontextu s jejich strukturou ukázalo, že 3-OH skupina (kaempferol) výrazně zvyšuje afinitu tohoto antioxidantu k HSA. 2,3 nenasycený kruh C (apigenin, kaempferol) se pravděpodobně pouze mírně podílí na zvýšení afinity k HSA.

Podle zářecího podílu  $Q$  vybrané antioxidanty měnily sekundární strukturu HSA v následujícím pořadí: kaempferol > naringenin > apigenin. Záporné změny Gibbsovy energie antioxidantů  $\Delta G$  svědčí o tom, že interakce všech tří antioxidantů s molekulou HSA probíhala spontánně.

## 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

**Artali R., Del Pra A., Foresti E., Lesci I. G., Roveri N., Sabatino P.:** Adsorption of human serum albumin on the chrysotile surface: a molecular dynamics and spectroscopic investigation. *J R Soc Interface*, 2008, 5: 273–283.

**Bian H., Zhang H., Yu Q., Chen Z., Liang H.:** Studies on the interaction of cinnamic acid with bovine serum albumin. *Chem Pharm Bull*, 2007, 55: 871-875.

**Fišar Z.:** Experimenty, 2004. (cit. 27.2. 2009). Dostupné z:  
<http://www1.lf1.cuni.cz/~zfisar/fluorescence/soubory/experimenty.htm>

**Fišar Z. :** Fluorescenční spektroskopie v neurovědách, 2005. (cit. 27.2. 2009). Dostupné z:  
<http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/Default.htm>

**Hofr C.:** Vlastní fluorescence proteinů - pokročilé biofyzikální metody v experimentální biologii, 2007. (cit. 27.2. 2009). Dostupné z:  
[http://is.muni.cz/el/1431/podzim2007/Bi7230/um/3973768/09\\_Protein.pdf](http://is.muni.cz/el/1431/podzim2007/Bi7230/um/3973768/09_Protein.pdf)

**Holeček V.:** Volné radikály, antioxidanty a jak dále? *Klin Biochem Metab*, 2006, 14: 140-145.

**Lakowicz J. R.:** Principles of Fluorescence Spectroscopy. 2. vyd., Springer, 1999.

**Lázníčková A., Kubíček V.:** Základy fyzikální chemie, vybrané kapitoly pro posluchače farmaceutické fakulty. 1. vyd., Nakladatelství Karolinum, 2001, str. 153, 157, 160 a 162.

**Min J., Xie M. X., Zheng D., Liu Y., Li X. Y., Chen X.:** Spectroscopic studies on the interaction of cinnamic acid and its hydroxyl derivates with human serum albumin. *J Mol Struct*, 2004, 692: 71-80.

**Otagiri M.:** A molecular functional study on the interactions of drugs with plasma proteins. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2005, 20: 309-323.

**Papadopoulou A., Green R. J., Frazier R. A:** Interaction of flavonoids with bovine serum albumin: A fluorescence quenching study. *J Agric Food Chem*, 2005, 53: 158-163.

**Paulová H., Bochořáková H., Táborská E.:** Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chem Listy*, 2004, 98: 174-179.

**Pietta P. G.:** Flavonoids as antioxidants. J Nat Prod, 2000, 63: 1035-1042.

**Spilková J., Dušek J.:** Vybrané přírodní látky s antioxidační aktivitou. Česká a slovenská farmacie, 1996, 45: 296-301.

**Švehlová K.:** Účinky antioxidantů přírodního původu v modelu glykace proteinů. Diplomová práce, Farmaceutická fakulta UK v Hradci Králové, Katedra biochemických věd, 2007, 16-19,62.

**Vaňková H.:** Peptidové mapy. Chem Listy, 1999, 93, 125.

**Xiao J., Suzuki M., Jiang X., Chen X., Yamamoto K., Ren F., Xu M.:** Influence of B-ring hydroxylation on interactions of flavonols with bovine serum albumin. J Agric Food Chem, 2008, 56: 2350-2356.

**Yuan J. L., Iv Z., Liu Z. G., Hu Z., Zou G. L.:** Study on interaction between apigenin and human serum albumin by spectroscopy and molecular modeling. J Photochem Photobiol A: Chemistry, 2007, 191: 104-113.

**Zhang Y., Li Y., Dong L., Li J., He W., Chen X., Hu Z.:** Investigation of the interaction between naringin and human serum albumin. J Mol Struct, 2008, 875: 1-8.