

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Lenka Rydlová

ENZYMOVÉ MODIFIKACE BIOLOGICKY AKTIVNÍCH FLAVONOIDŮ

Enzymatic modifications of bioactive flavonoids

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. Eva Tesařová, CSc.

Konzultanti: doc. Ing. Kateřina Valentová, Ph.D.

prof. Ing. Vladimír Křen, DrSc.

Praha 2017

---

Tato diplomová práce byla vypracována na Katedře fyzikální a makromolekulární chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze a na Mikrobiologickém ústavu AV ČR v letech 2015 – 2017. Práce byla finančně podporována projektem Grantové agentury České republiky GAČR 15-03037S (2015-2017).

#### Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 15. května 2017.

---

## Abstrakt

Extrakt z ostropestřce mariánského (*Silybum marianum* (L.) Gaertn., synonymum *Carduus marianus* L., Asteraceae) silymarin obsahuje mimo jiné složky především bioaktivní flavonolignany. Ty mají hepatoprotektivní a antioxidační účinky a rovněž protirakovinnou, chemoprotektivní, dermatoprotektivní a hypocholesterolemickou aktivitu.

Tato práce se zaměřuje na přípravu metabolitů druhé fáze biotransformace neprozkoumaných flavonolignanů 2,3-dehydrosilybinu (DHSB), silychristinu (SCH), 2,3-dehydrosilychristinu (DHSCH). Čisté sulfatované deriváty byly připraveny za použití aryl sulfotransferasy z *Desulfitobacterium hafniense*. Jako donor sulfátu byl použit *p*-nitrofenyl sulfát (*p*-NPS). Flavonolignany tvoří monosulfáty výhradně na pozici C-20 (v případě silychristinu a 2,3-dehydrosilychristinu na pozici C-19), s výjimkou 2,3-dehydrosilybinu, který také tvoří 7,20-*O*-disulfatované deriváty.

U všech vzorků byly provedeny antioxidační testy – zhášení DPPH radikálu (nejvyšší aktivitu měl 2,3-dehydrosilychristin sulfát:  $IC_{50}=7,87 \mu M$ ), redukce Folin-Ciocalteuova činidla (nejaktivnější byl 2,3-dehydrosilychristin: 1,58 ekvivalentů gallové kyseliny), zhášení ABTS<sup>•+</sup> radikálu (nejvyšší aktivita naměřena u silychristinu: 1,50 ekvivalentů vitamínu C), inhibice peroxidace lipidů (nejvyšší aktivitu měl 2,3-dehydrosilybin:  $IC_{50} = 10,6 \mu M$ ), test FRAP (nejvyšší aktivitu měl 2,3-dehydrosilybin disulfát: 1,61 ekvivalenty  $Fe^{3+}$ ) a zhášení DMPD<sup>•+</sup> radikálu (nejvyšší aktivita byla naměřena u 2,3-dehydrosilybin disulfátu: 1,90 ekvivalentů vitamínu C).

Součástí této práce byla také studie tvorby glukuronidů silychristinu. Na základě provedených experimentů byla potvrzena jejich tvorba.

## Klíčová slova

silymarin, flavonolignany, silybin, 2,3-dehydrosilybin, silychristin, 2,3-dehydrosilychristin, sulfatace, glukuronidace, arylsulfotransferasa

---

## Abstract

Extract from milk thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertn., synonym *Carduus marianus* L., Asteraceae) silymarin contains among others primarily bioactive flavonolignans. They have hepatoprotective and antioxidative effects and also anticancer, chemoprotective, dermatoprotective and hypocholesterolemic activity.

This thesis focuses on the preparation of metabolites of the second phase of biotransformation unexplored flavonolignans 2,3-dehydrosilybin (DHSB), silychristin (SCH), 2,3-dehydrosilychristin (DHSCH). Pure sulfated derivatives were prepared using aryl sulfotransferase from *Desulfotobacterium hafniense* and *p*-nitrophenyl sulfate (*p*-NPS) as a donor. Flavonolignans yield exclusively monosulfates at the position C-20 (C-19 in the case of silychristin and 2,3-dehydrosilychristin), except for 2,3-dehydrosilybin that gives also the 7,20-disulfated derivatives.

For all samples were made antioxidant tests – DPPH assay (the highest activity had 2,3-dehydrosilychristin sulfate:  $IC_{50} = 7,87 \mu M$ ), Folin-Ciocalteu reduction assay (the highest activity had 2,3-dehydrosilychristin: 1,58 ekvivalents of gallic acid), ABTS<sup>•+</sup> scavenging (the highest activity had silychristin: 1,50 ekvivalents of vitamin C), inhibition of microsomal lipid peroxidation (the highest activity had 2,3-dehydrosilybin:  $IC_{50} = 10,6 \mu M$ ), FRAP assay (the highest activity had 2,3-dehydrosilybin disulfate: 1,61 ekvivalents of  $Fe^{3+}$ ) and DMPD assay (the highest activity had 2,3-dehydrosilybin disulfate: 1,90 ekvivalents of vitamin C).

Part of this work was also study of glucuronides of silychristin. Its creation was confirmed based on the experiments.

## Keywords

silymarin, flavonolignans, silybin, 2,3-dehydrosilybin, silychristin, 2,3-dehydrosilychristin, sulfation, glucuronidation, aryl sulfotransferase

## Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí práce paní prof. RNDr. Evě Tesařové CSc. za vedení a konzultace, doc. Ing. Kateřině Valentové, Ph.D. za vedení, cenné rady a připomínky a prof. Ing. Vladimíru Křenovi, DrSc. za umožnění vypracování této práce v Laboratoři biotransformací Mikrobiologického ústavu AV ČR. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Lucii Petráskové, Ph.D. za pomoc s analýzami a vyhodnocením HPLC spekter, Pavle Oubrechtové za pomoc při transformaci buněk, přípravě enzymu a sulfátů a při stanovování biologické aktivity, Bc. Kristýně Káňové za pomoc při práci v laboratoři, Pavlu Vávrovi za pomoc při detekci a zpracování frakcí a také ostatním spolupracovníkům v Laboratoři biotransformací.

Také bych ráda poděkovala RNDr. Heleně Pelantové, Ph.D. (Laboratoř charakterizace molekulární struktury, MBÚ AV ČR) za určení struktur látek pomocí NMR spektroskopie a doc. RNDr. Josefu Cvačkovi, Ph.D. (ÚOCHB AV ČR) za změření HRMS spekter.

Závěrem bych chtěla poděkovat také své rodině za obrovskou podporu nejen během studií.

---

**Obsah**

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>- 10 -</b>
<b>2</b>	<b>Teoretická část</b>	<b>- 12 -</b>
<b>2.1</b>	<b>Polyfenolové sloučeniny</b>	<b>- 12 -</b>
2.1.1	Fenolové kyseliny	- 13 -
2.1.2	Stilbeny	- 14 -
2.1.3	Diferuloylmethany	- 14 -
2.1.4	Lignany	- 14 -
2.1.5	Flavonoidy	- 15 -
2.1.6	Taniny	- 15 -
2.1.7	Flavonolignany	- 15 -
<b>2.2</b>	<b>Biotransformace xenobiotik</b>	<b>- 20 -</b>
2.2.1	Interakce flavonolignanů s enzymy I. fáze biotransformace	- 20 -
2.2.2	Interakce s enzymy II. fáze biotransformace	- 21 -
<b>2.3</b>	<b>Metabolismus flavonoidů</b>	<b>- 25 -</b>
<b>3</b>	<b>Experimentální část</b>	<b>- 27 -</b>
<b>3.1</b>	<b>Pomůcky a přístroje</b>	<b>- 27 -</b>
<b>3.2</b>	<b>Chemikálie</b>	<b>- 27 -</b>
<b>3.3</b>	<b>Biologický materiál</b>	<b>- 28 -</b>
<b>3.4</b>	<b>Roztoky</b>	<b>- 28 -</b>
<b>3.5</b>	<b>Příprava flavonolignanů</b>	<b>- 30 -</b>
<b>3.6</b>	<b>Příprava sulfátů flavonolignanů</b>	<b>- 30 -</b>
<b>3.7</b>	<b>Příprava glukuronidů flavonoidů</b>	<b>- 33 -</b>
<b>3.8</b>	<b>Charakteristika sulfátů (struktura a čistota)</b>	<b>- 34 -</b>
<b>3.9</b>	<b>Antiradikálové a antioxidační testy</b>	<b>- 35 -</b>
3.9.1	Zhášení 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylvého radikálu	- 36 -
3.9.2	Zhášení radikálu 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové kyseliny)	- 37 -
3.9.3	Redukce Folin-Ciocalteuova činidla	- 37 -
3.9.4	Inhibice peroxidace lipidů	- 37 -
3.9.5	Test schopnosti redukovat železité ionty	- 38 -
3.9.6	Zhášení <i>N,N</i> -dimethyl- <i>p</i> -fenylendiaminového radikálu	- 38 -
<b>3.10</b>	<b>Statistické zpracování výsledků</b>	<b>- 39 -</b>

---

<b>4</b>	<b>Výsledky a diskuse</b>	<b>- 40 -</b>
<b>4.1</b>	<b>Sulfáty</b>	<b>- 40 -</b>
4.1.1	Stanovení enzymu a jeho aktivity	- 40 -
4.1.2	Studie časového průběhu vzniku sulfátů	- 40 -
4.1.3	Purifikace sulfatovaných produktů	- 45 -
4.1.4	Charakterizace sulfátů	- 46 -
4.1.5	Zhášení 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylového radikálu	- 52 -
4.1.6	Zhášení radikálu 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové kyseliny)	- 53 -
4.1.7	Redukce Folin-Ciocalteuova činidla	- 54 -
4.1.8	Test schopnosti redukovat železitě ionty	- 55 -
4.1.9	Zhášení <i>N,N</i> -dimethyl- <i>p</i> -fenylendiaminového radikálu	- 56 -
4.1.10	Inhibice peroxidace lipidů	- 57 -
4.1.11	Zhodnocení biologické aktivity	- 57 -
<b>4.2</b>	<b>Glukuronidy</b>	<b>- 60 -</b>
<b>5</b>	<b>Závěr</b>	<b>- 62 -</b>
<b>6</b>	<b>Literatura</b>	<b>- 63 -</b>

---

## Seznam zkratek a použitých symbolů

ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)
ACN	acetonitril
ArylST	aryl sulfotransferasy
AST	bakteriální aryl sulfotransferasa
ATP	adenosin trifosfát
CE	ekvivalenty vitamínu C
CoA	koenzym A
CYP	cytochromy P450
DHSB	2,3-dehydrosilybin
DHSBS	2,3-dehydrosilybin-20- <i>O</i> -sulfát
DHSBSS	2,3-dehydrosilybin-7,20- <i>O</i> -disulfát
DHSCH	2,3-dehydrosilychristin
DHSCHS	2,3-dehydrosilychristin-19- <i>O</i> -sulfát
DHSCHSS	2,3-dehydrosilychristin disulfát
DMPD	<i>N,N</i> -dimethyl- <i>p</i> -fenylendiamin
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPPH	2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl
DTT	dithiothreitol
FCR	Folin-Ciocalteuovo činidlo
FRAP	schopnost redukovat železité ionty (ferric reducing antioxidant power)
GAE	ekvivalenty gallové kyseliny
gCOSY	gradient correlation spectroscopy
gHMBC	gradient heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy
gHSQC	gradient heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy
GSTs	glutathion- <i>S</i> -transferasy
HLM	lidské jaterní mikrosomy
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HRMS	vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie
IPTG	isopropyl β-D-1-thiogalaktopyranosid



---

KNM	kanamycin
LB	Luria-Bertani medium
LBA	Luria-Bertani agar
LPX	inhibice lipoperoxidace mikrosomů
MF	mobilní fáze
MS	hmotnostní spektrometrie
NATs	<i>N</i> -acetyltransferasy
NMR	nukleární magnetická resonance
<i>p</i> -NP	<i>p</i> -nitrofenyl
<i>p</i> -NPS	<i>p</i> -nitrofenylsulfát
PAP	3'-fosfoadenosin-5'-fosfát
PAPS	3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát
PBS pufr	fosfátový pufr s NaCl
SDS	dodecylsírán sodný
SCH	silychristin
SCHS	silychristin-19- <i>O</i> -sulfát
SCHSS	silychristin disulfát
STs	membránové sulfotransferasy
SULTs	cytosolové transferasy
TBA-TCA	kyselina thiobarbiturová-kyselina trichloroctová
TBH	<i>t</i> -butyl hydroperoxid
TCK	tetracyklin
TEMED	tetramethylethylendiamin
TLC	tenkovrstvá chromatografie
UDPGA	5'-difosfoglukuronová kyselina
UDPGT	5'-difosfoglukuronyl transferasa
UGTs	UDP-glukuronosyltransferasy

## 1 Úvod

Bylinné léky, rostlinné extrakty, odvary či nálevy jsou tradičně využívány pro léčbu a podporu léčby různých nemocí. Jednou z léčivých rostlin používaných po staletí je ostropestřec mariánský (*Silybum marianum* (L.) Gaertn., synonymum *Carduus marianus* L., Asteraceae, viz obr. 1.1) [1], jedna z nejstarších důkladně prozkoumaných rostlin známých již z antických dob a využívaných pro léčbu poruch jater a žlučníku, zahrnujících hepatitidu, cirhózu a ochranu před otravou muchomůrkou zelenou (*Amanita phalloides*, E. M. Fries) a dalšími toxiny [2-4]. Extrakt ze semen (správně plodů) ostropestřce je znám jako silymarin a je využíván ve farmaceutických produktech a rostlinných preparátech pro léčbu akutních i chronických onemocnění jater [5]. Má schopnost zabránit jaterním poruchám vznikajících v důsledku např. alkoholické cirhózy, je to účinné antidotum proti akutním otravám a má také silnou protizánětlivou aktivitu [1]. Antioxidační vlastnosti silymarinu byly zaznamenány *in vitro* i ve studiích na zvířatech. Silymarin je schopen vychytávat volné radikály, má protinádorovou aktivitu proti lidským nádorům (např. prostaty a vaječnicků) a může také pomáhat v ochraně proti cytotoxicitě indukované nikotinem. Silymarin reprezentuje unikátní směs flavonoidů, jeho majoritní aktivní složkou je silybin [1], obsahuje však také jeho analogy isosilybin, silychristin, silydianin, aj. (viz kapitola 2.1.7) a flavanol taxifolin [5].



Obr. 1.1 Ostropestřec mariánský (fotografie ze soukromého alba autorky)

---

Cílem této interdisciplinární studie byla příprava autentických standardů metabolitů II. fáze biotransformace vybraných minoritních složek silymarinu (2,3-dehydrosilybin, silychristin a 2,3-dehydrosilychristin), sulfátů pomocí aryl sulfotransferasy z *Desulfitobacterium hafniense*, případně glukuronidů pomocí lidských jaterních mikrosomů. Součástí byla purifikace a příprava jednotlivých sulfátů v dostatečném množství a čistotě pro další analýzy, charakterizaci a studium antioxidační/antiradikálové aktivity sulfátů v porovnání s původními látkami.

---

## 2 Teoretická část

### 2.1 Polyfenolové sloučeniny

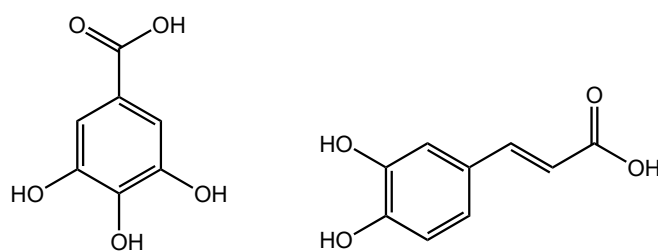
Fenolové sloučeniny představují jednu z nejpočetnějších a nejpestřejších skupin produktů sekundárního metabolismu rostlin a jsou nedílnou součástí lidské výživy [6]. Vyskytují se prakticky ve všech rostlinných potravinách (zelenina, obilí, luštěniny, ovoce, ořechy) a nápojích (víno, jablečný mošt, pivo, čaj, kakao) a jsou částečně zodpovědné za jejich výživovou kvalitu [7, 8]. Trpkost a hořkost potravin i nápojů souvisí právě s obsahem mj. polyfenolových látek. V minulosti se potravinové polyfenoly zkoumaly hlavně v souvislosti s jejich škodlivými účinky. Některé z nich totiž mají schopnost vázat se na vysrážené makromolekuly (např. bílkoviny, sacharidy, trávicí enzymy), čímž snižují jejich stravitelnost. V posledních několika desetiletích se však tento trend změnil a zájem o tyto látky vzrůstá i vzhledem k jejich antioxidační aktivitě (vychytávání volných radikálů, chelatace kovů) a s tím souvisejícími příznivými účinky na lidský organismus (léčba a prevence rakoviny, kardiovaskulární a jiné choroby). Epidemiologické studie ukazují korelaci mezi zvýšenou spotřebou fenolových antioxidantů a sníženým rizikem kardiovaskulárních chorob a určitých typů rakoviny [7, 9]. Mírná spotřeba červeného vína, které je bohaté na polyfenoly, je spojována s nižším rizikem ischemické choroby srdeční. Polyfenoly jsou nepostradatelnou součástí fyziologie rostlin, podílejí se na růstu i reprodukci a poskytují rezistenci vůči patogenům a predátorům. Dají se také využít v mnoha průmyslových aplikacích: výroba barviv, papíru, kosmetiky nebo jako potravinová aditiva (přírodní barviva a konzervanty). Flavonoidy, jako jedna ze skupin fenolových látek, se používají jako antibiotika, protizánětlivá činidla, ale také při léčbě hypertenze, hypercholesterolemie atd. Pravděpodobně nejznámější vlastností polyfenolových látek je jejich schopnost vázat a srážet proteiny. Přestože je tato schopnost běžná pro většinu polyfenolů díky jejich vysokému stupni hydroxylace, nízkomolekulární fenoly nejsou schopny proteiny precipitovat. Aby oligomery efektivně precipitovaly protein, musí obsahovat alespoň tři flavonolové podjednotky. Vysoce polymerované taniny (trísloviny) jsou v precipitaci proteinů vůbec nejefektivnější, čehož se tradičně využívá např. v koželužství. Komplexy tanin-protein jsou obvykle provázány vodíkovými vazbami a hydrofobními interakcemi bez podílu kovalentní nebo iontové vazby [7]. Hodnocení antioxidační schopnosti biologicky aktivních sloučenin je hlavním

krokem k lepšímu chápání jejich mechanismu účinku na molekulární úrovni v prostředí buňky [10].

Přírodní fenolové látky se rozdělují do jednotlivých tříd na základě jejich chemické struktury [7]. Podle nejnovější definice by termín „polyfenol“ měl být používán výhradně pro *rostlinné sekundární metabolity produkované šikimátovou fenyylpropanoidovou a/nebo polyketidovou metabolickou drahou, obsahující více než jedno aromatické jádro substituované hydroxylovými skupinami a neobsahující ve své základní struktuře dusíkaté funkční skupiny*. Tato definice však nezahrnuje látky obsahující jen jednu fenolovou skupinu, zejména fenolové kyseliny, které jsou biogenetickými prekurzory, ale také metabolity polyfenolů, a jejichž studium je se studiem polyfenolů nerozlučně spjato. V odborné literatuře se tak v posledních letech setkáváme s termínem (poly)fenoly [8]. Je známo více než 8000 fenolových struktur, z nich je identifikováno okolo 4000 flavonoidů. Diverzita a široké rozšíření polyfenolů v rostlinách vedlo k různým typům kategorizace těchto přirozeně se vyskytujících sloučenin. Rozdělují se podle zdroje původu, biologické funkce a chemické struktury. Většina polyfenolů v rostlinách existuje ve formě glykosidů s různými cukernými jednotkami a acylovanými cukry na různých pozicích polyfenolových skeletů [11].

### 2.1.1 Fenolové kyseliny

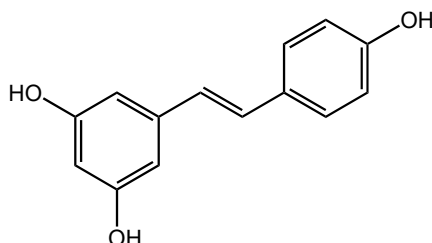
Fenolové kyseliny jsou neflavonoidní fenolové sloučeniny, které mohou být dále rozděleny na i) deriváty benzoové kyseliny s C1-C6 (gallová, syringová, vanilová kyselina) a ii) deriváty skořicové kyseliny s C3-C6 uhlíkovým řetězcem (kumarová, ferulová, kávová, sinapová kyselina, viz obr. 2.1). V ovoci a zelenině se vyskytují zejména volné fenolové kyseliny, v zrnech a semenech (zvláště v otrubách a luscích) jsou fenolové kyseliny obvykle ve vázané formě. Tyto kyseliny mohou být hydrolyzovány pouze kyselou nebo alkalickou hydrolyzou, případně působením enzymů [11].



Obr. 2.1 Strukturní vzorce gallové a kávové kyseliny

## 2.1.2 Stilbeny

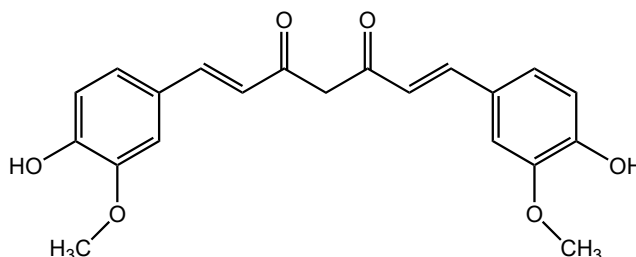
Stilbeny jsou strukturně charakterizované přítomností 1,2-difenylethylenového jádra s hydroxyly substituovanými aromatickými kruhy a existující ve formě monomerů nebo oligomerů. Nejznámějším stilbenem je *trans*-resveratrol (obr. 2.2) [12].



Obr. 2.2 Strukturní vzorec *trans*-resveratrolu (*trans*-3,4',5-trihydroxystilben)

## 2.1.3 Diferuloylmethany

Diferuloylmethany jsou malá skupina fenolových sloučenin se dvěma aromatickými kruhy substituovanými hydroxyly a spojeny alifatickým řetězcem karbonylové skupiny. Do této skupiny patří například kurkumin (obr. 2.3) [12].



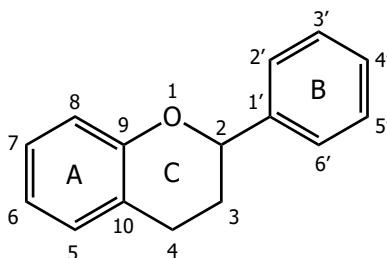
Obr. 2.3 Strukturní vzorec kurkuminu

## 2.1.4 Lignany

Lignany patří do skupiny fenylypropanoidů. Vznikají oxidativní dimerizací dvou fenylypropanových jednotek, které jsou spojené centrálními uhlíky jejich propanových bočních řetězců. Lignanů se vyskytuje více než tisíc a stále přibývají objevy nových látek tohoto typu. Pokud je při biosyntéze kombinováno spojení fenylypropanoidů s látkami jiného původu (např. terpenoidy), vznikají tzv. hybridní lignany (lignoidy) [13].

### 2.1.5 Flavonoidy

Flavonoidy reprezentují drtivou většinu rostlinných fenolů. Většina těchto látek má malou relativní hmotnost a jsou rozpustné ve vodných roztocích v závislosti na jejich polaritě a chemické struktuře [7]. Flavonoidy mají C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> hlavní uhlíkatý řetězec, ve kterém obě C<sub>6</sub> jednotky (kruh A a kruh B) jsou aromatické povahy (obr. 2.4) [11]. Jsou to nejhojněji se vyskytující polyfenoly v lidské výživě a dělí se do dvou hlavních skupin – anthokyaniny (glykosylované deriváty anthokyanidinu, přítomné v barevných květech a plodech) a anthoxanthiny (skupina bezbarvých sloučenin) [12]. Anthoxanthiny se dále dělí mj. na flavonoly (myricetin, kvercetin, kaempferol), flavony (apigenin, luteolin), flavanonoly (taxifolin), flavan-3-oly (katechin, epicatechin), flavanony (hesperetin, naringenin) a isoflavonoidy (genistein, daidzein) [14]. Isoflavonoidy se vyskytují např. v sójových bobech [15]. Flavonoidy jsou zodpovědné za žluté, červené a modré zbarvení květů a plodů rostlin. Tyto pigmenty jsou současně nejčastěji se vyskytujícími sekundárními metabolity rostlin v lidské výživě [16].



Obr. 2.4 Základní flavonoidní skelet

### 2.1.6 Taniny

Taniny jsou ve vodě rozpustné polyfenoly o molekulární hmotnosti 500-3000, které jsou rozděleny na kondenzované a hydrolyzovatelné taniny a často nalezené v komplexu s alkaloidy, polysacharidy a proteiny [12].

### 2.1.7 Flavonolignany

Flavonolignany jsou polyfenoly složené z flavonoidové a lignanové části. Dají se lehce oxidovat a projevují řadu biologických účinků: antioxidační/prooxidační, hepatoprotektivní a chemoprotektivní. Pro tyto sloučeniny je typický pleiotropní efekt

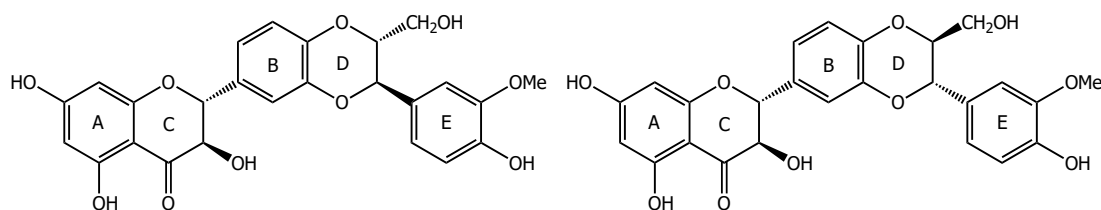
[5]. Většina z biologických aktivit přírodních a také synteticky připravených flavonolignanů byla stanovena *in vitro* s použitím buněčných modelů. Kromě silybinu není mechanismus účinku flavonolignanů, tj. reaktivita, schopnost oxidace, radikálová chemie a biomolekulární interakce dostatečně dokumentovaný na molekulární úrovni [10]. Nejznámějším zdrojem flavonolignanů je silymarin, jehož hlavními složkami je silybin A, silybin B, isosilybin A, isosilybin B, silychristin A, silydianin, taxifolin a asi 30 % nedefinované polymerní frakce. Mezi minoritní flavonolignany pak patří zejména 2,3-dehydroflavonolignany, tedy 2,3-dehydrosilybin, 2,3-dehydrosilydianin a 2,3-dehydrosilychristin [10]. Silybin (ekvimolární diastereomerní směs A a B) je snadno dostupný díky jeho velkému zastoupení v silymarinu (30 %) a také díky jeho snadné izolaci (precipitace ethanolem). Izolace obou čistých diastereomerů A a B v multigramových množstvích je možné docílit pokročilými chemo-enzymatickými metodami [17]. Zbývající flavonolignany se podařilo preparativně izolovat až teprve nedávno, kdy byly použity nové metody založené na kombinaci enzymatické diskriminace, chromatografie a gelové filtrace [18]. Biologická aktivita silymarinu jako celku nemusí být stejná jako aktivita jednotlivých čistých složek [19]. Flavonolignany ze silymarinu jsou používány jako nutraceutika s prokázanými ochrannými účinky využitelnými v medicíně a profylaktické léčbě [20].

### ***Silybin a 2,3-dehydrosilybin***

Silybin (obr. 2.5) je hlavním a nejvíce prozkoumaným flavonolignanem komplexu silymarinu [10, 21]. Hepatoprotektivní aktivita silybinu zahrnuje několik mechanismů fungujících na různých buněčných úrovních. Silybin působí jako vychytávač volných radikálů, tzn., že odstraňuje reaktivní toxické radikály vznikající jako vedlejší produkt mnoha procesů, např. oxidační dekarboxylace, dýchacího řetězce, oxidační detoxikace xenobiotik či imunitní reakce. Urychlení buněčné regenerace je spojováno se schopností silybinu aktivovat syntézu proteinů stimulací DNA-dependentní-RNA-polymerasy I. Silybin je také inhibitorem lidské střevní  $\beta$ -glukuronidasy - blokuje exkreci a reabsorpci volných xenobiotik a jejich metabolitů ze svých glukuronidových konjugátů [21]. V komerční sféře je silybin využíván v čisté formě a/nebo jako integrální součást rostlinného extraktu silymarinu [10]. V silymarinu se také vyskytuje 2,3-dehydrosilybin (obr. 2.6), ovšem v minoritním množství (také jako směs enantiomerů) pravděpodobně



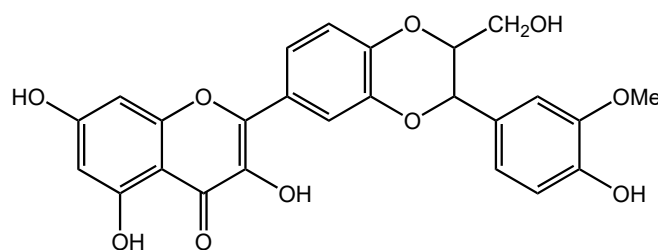
výsledkem spontánní oxidace silybinu. Oproti silybinu má mnohem vyšší protinádorovou a antioxidační aktivitu [22, 23], aktivita proti toxinům muchomůrky zelené je však značně nižší [23]. Skupiny C-3 OH a C-20 OH u 2,3-dehydrosilybinu hrají významnou roli v jejich schopnosti vychytávat volné radikály [10]. 2,3-Dehydrosilybin má také pozitivní účinky na některé kožní nemoci (např. atopický ekzém) [23], je silným protektantem vůči  $H_2O_2$ -indukovanému oxidačnímu stresu v lidských keratinocytech a myších fibroblastech, potlačuje účinky oxidačního stresu na kůži po působení UVA záření a také snižuje tvorbu reaktivních oxidačních forem (ROS) v potkaních srdečních mitochondriích [24]. 2,3-Dehydrosilybin byl původně izolován z extraktu ze semen ostropestřce mariánského, avšak kvůli jeho minoritnímu zastoupení se v současnosti připravuje oxidací silybinu [23].



Obr. 2.5 Strukturální vzorce silybinu A a B

Silybin i 2,3-dehydrosilybin jsou biologicky aktivní přírodní látky, které působí na mnoha buněčných úrovních. Mechanismus antiradikálové aktivity těchto látek je možné odvodit ze struktur dimerních produktů, které byly získány radikálovými reakcemi selektivně methylovaných derivátů silybinu a 2,3-dehydrosilybinu. Radikálová oxidace silybinu methylovaného v poloze 7-OH a 2,3-dehydrosilybinu methylovaného na 3-OH a 7-OH poskytuje C-C a C-O dimery, které umožňují objasnit molekulární mechanismus antiradikálové aktivity jejich kruhu E, čímž poukazují na důležitost polohy 20-OH. Současně byla potvrzena i klíčová role polohy 3-OH v antiradikálové aktivitě 2,3-dehydrosilybinu pomocí tvorby dalšího typu dimeru z jeho selektivně methylovaného derivátu. Znalost aktivních míst obou molekul umožňuje vyvinout selektivní syntézy esterů silybinu a 2,3-dehydrosilybinu např. s gallovou kyselinou (sama poměrně účinný antioxidant), aniž by došlo k zablokování aktivních pozic silybinu nebo 2,3-dehydrosilybinu, což představuje cestu k novým derivátům se zvýšenými antioxidačními [25], ale také anti-angiogenními aktivitami [26, 27]. Zejména pro silybin a 2,3-

dehydrosilybin byl stanoven vztah mezi jejich strukturou a schopností vylučovat volné radikály. Studie mechanismu vylučování volných radikálů flavonolignanů současně na experimentálních i teoretických modelech odhalila důležitost OH skupin a rozdíly mezi silybinem a 2,3-dehydrosilybinem. U silybinu a jeho derivátů bylo zjištěno, že mechanismus přenosu vodíku je méně efektivní, převládá tedy mechanismus přenosu elektronů. Naopak hlavní mechanismus vylučování volných radikálů v případě 2,3-dehydrosilybinu a jeho derivátů je právě mechanismus přenosu vodíku [28]. Nejdůležitější je studium těchto molekul za fyziologických podmínek (pH=7,4) [1].



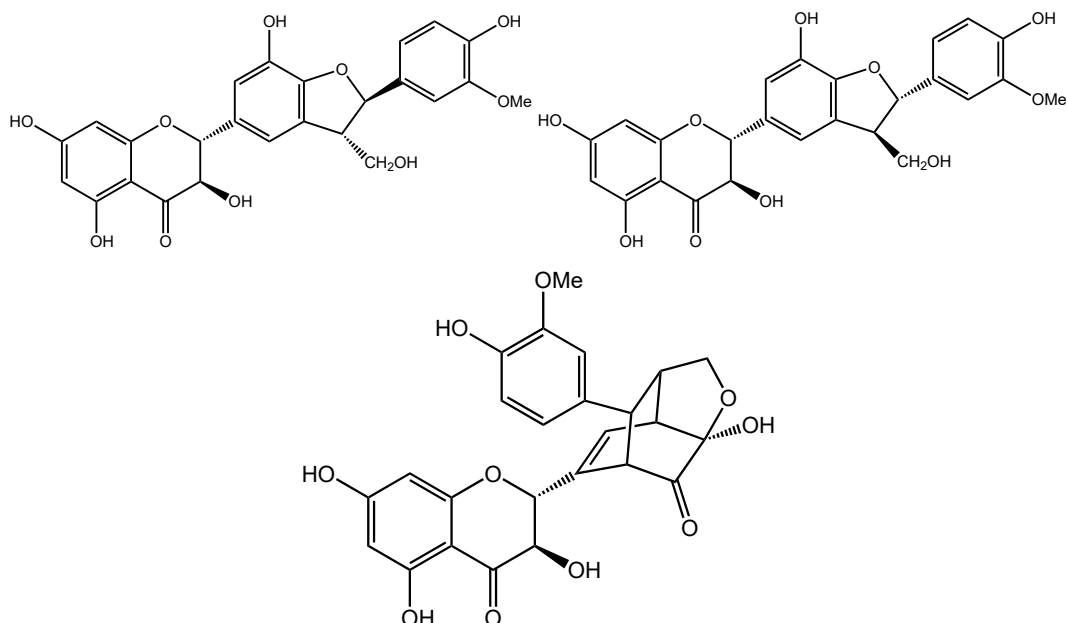
Obr. 2.6 Strukturální vzorec 2,3-dehydrosilybinu

### ***Silychristin, silydianin, 2,3-dehydrosilychristin a 2,3-dehydrosilydianin***

Silychristin (obr. 2.7) je druhý nejhojněji se vyskytující flavonolignan v plodech ostropestřce mariánského. Má unikátní skelet (vysoce substituovaný trans-dihydrobenzofuran) a projevuje se biologickými (antihepatotoxickými) účinky [29]. V přírodě se vyskytuje ve formě dvou diastereomerů – silychristin A a silychristin B. Silychristin A převládá v přírodních materiálech s diastereomerním poměrem přibližně 95:5 (v závislosti na zdroji) [30].

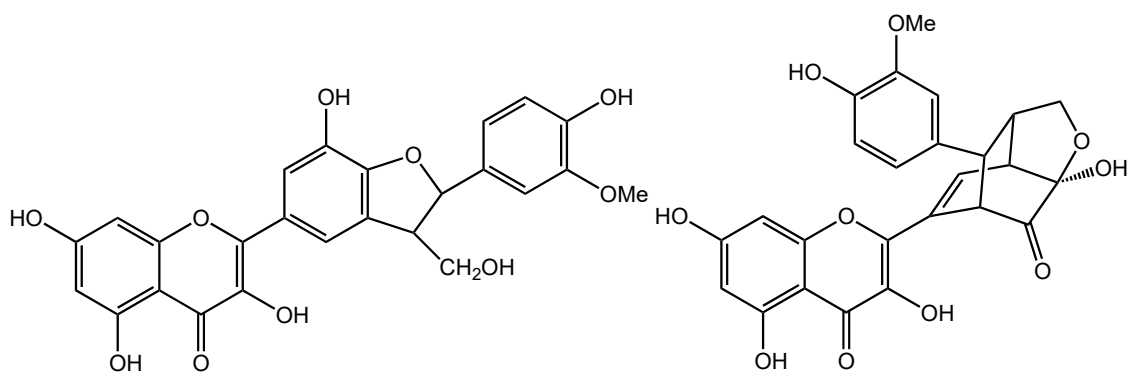
Silydianin (obr. 2.7) je také jedním z hlavních flavonolignanů, které jsou obsaženy v ostropestřci mariánském [16]. Na rozdíl od ostatních flavonolignanů má silydianin unikátní strukturu. Přestože je struktura silydianinu komplikovaná, vzniká stejným radikálovým spojením taxifolinu a koniferyl alkoholu jako všechny ostatní flavonolignany v silymarinu. Jediným podstatným rozdílem je radikálová vazba 1,4 místo 1,2 (tvoří bicyklickou strukturu) a účast primární alkoholické skupiny koniferyl alkoholu na tvorbě hemiacetalové struktury. Biologická aktivita silydianinu byla studována pouze v omezeném rozsahu. Silydianin má protizánětlivou aktivitu, ovlivňuje buněčné membrány, chová se jako vylučovač volných radikálů a může také regulovat aktivaci kaspázy-3, což je první krok apoptózní kaskády [31]. Silydianin snižuje oxidativní

metabolismus polymorfonukleárních neutrofilů, jejich chování je spojeno se zvýšením konzumace kyslíku. V porovnání se silybinem, má silydianin silnější antioxidační schopnosti [32].



Obr. 2.7 Strukturální vzorec silychristinu A, B a silydianinu

2,3-Dehydrosilychristin je derivátem silychristinu a vzniká jeho vzdušnou oxidací (ještě v rostlinném materiálu či v průběhu extrakce, připraven byl poprvé v roce 1982) [30], 2,3-dehydrosilydianin vzniká oxidací silydianinu. Oba 2,3-dehydroderiváty se vyskytují ve stopovém množství pravděpodobně ve všech komerčních preparátech silymarinu, mají řádově vyšší biologickou aktivitu než majoritní flavonolignany [10] a jejich studium je tudíž zásadní pro poznání všech, i možných vedlejších, účinků doplňků stravy obsahujících silymarin.



Obr. 2.8 Strukturální vzorec 2,3-dehydrosilychristinu a 2,3-dehydrosilydianinu

## 2.2 Biotransformace xenobiotik

Metabolická detoxikace jakékoli cizorodé sloučeniny (xenobiotika) vstupující do lidského organismu v sobě zahrnuje různé mechanismy [33]. Biotransformace xenobiotik probíhá obvykle ve dvou krocích. Během prvního kroku (I. fáze) podléhají sloučeniny oxidaci, hydrolýze nebo redukci (méně často), což vede k tvorbě hydroxylových, aminových, karboxylových nebo thiolových skupin v molekule. Dochází k tvorbě primárních metabolitů. Ve druhém kroku (II. fáze) podléhají tyto nově vzniklé primární metabolity konjugačním reakcím s endogenními sloučeninami za tvorby sekundárních metabolitů. První fáze biotransformace je exotermická, druhá fáze je naopak endotermická [34].

V mnoha případech je nutné, aby první fáze biotransformace proběhla před konjugačními reakcemi, ovšem v případě, že se v molekule xenobiotika již při vstupu do organismu vyskytují výše zmiňované funkční skupiny, může ke konjugaci dojít přímo (bez první fáze). Hlavní cestou eliminace hydrofobních sloučenin (léky, pesticidy, endogenní steroidní hormony) ze savčího těla je konjugace hydroxylové, karboxylové, thio- a amino- skupiny s polárními skupinami následována exkrecí ledvinami [35]. Druhá fáze nevede jen k inaktivaci původní látky a jejích primárních metabolitů, ale také ke zvýšení hydrofility, a tudíž zvýšené exkreci (kromě acetylace a methylace). Konjugace také zvyšuje molekulární hmotnost a tím vytváří sloučeniny přístupnější k exkreci žlučí, zejména jako konjugáty glukuronidů a glutathionu [34].

### 2.2.1 Interakce flavonolignanů s enzymy I. fáze biotransformace

V první fázi obrany organismu proti xenobiotikům jsou zapojovány enzymy I. fáze biotransformace, zejména enzymy z rozsáhlé třídy monooxygenáz známých jako cytochromy P450 (CYP). Substráty těchto enzymů jsou v organismu biotransformovány na polárnější produkty, které jsou snáze vyloučitelné a nedochází tak k jejich nežádoucí akumulaci v těle. Může však také docházet k tvorbě biologicky aktivnějších derivátů (pozitivní i negativní hledisko). Díky znalosti metabolismu xenobiotika je tedy potenciálně možné zvýšení účinku léčiv nebo snižování jejich účinků vedlejších [33]. Největší množství CYP je exprimováno v hepatocytech, méně ve střevech nebo v ostatních extrahepatálních tkáních. Na metabolismu xenobiotik se podílejí zejména

---

enzymy CYP1A1/2, CYP2C8/9, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A4. CYP jsou schopné biotransformace silybinu a jeho kongenerů i přes mnohačetné hydroxylové skupiny, které jsou již přítomné v molekule [36]. Na druhou stranu aktivita rekombinantního CYP1A1 byla inhibována silybinem a ještě účinněji 2,3-dehydrosilybinem [37].

### 2.2.2 Interakce s enzymy II. fáze biotransformace

Druhá fáze biotransformace bývá nazývána konjugační nebo syntetická a dochází v ní k interakci vzniklého metabolitu z první fáze s tzv. konjugačním činidlem (agens). Touto reakcí vzniká konjugační produkt (konjugát), většinou velmi polární, disociovaný ve fyziologickém pH (výjimku tvoří acetylace a methylace, při nichž nedochází ke vzniku polárnějších metabolitů) a hydrofilnější než původní molekula. Konjugát se znovu neabsorbuje, ale je vylučován z organismu močí nebo žlučí. Reakce druhé fáze biotransformace probíhají rychleji, než ve fázi první; energie, která je v konjugačních reakcích potřeba, je využita z rezerv ATP [38, 39].

Enzymy druhé fáze hrají důležitou roli v biotransformaci nejen xenobiotik, ale i endogenních sloučenin (eobiotik) a katalyzují glukuronidaci, sulfataci, methylaci, acetylaci a konjugaci s glutathionem nebo aminokyselinami [34]. Enzymy druhé fáze jsou nejčastěji transferasy a zahrnují např. UDP-glukuronosyltransferasy (UGTs), sulfotransferasy (SULTs), *N*-acetyltransferasy (NATs), glutathion *S*-transferasy (GSTs) a různé methyltransferasy. Přestože je druhá fáze biotransformace obvykle detoxikační, vzniklé konjugáty mohou vyvolat nepříznivé účinky (např. konjugáty chovající se jako nosiče pro potenciálně karcinogenní sloučeniny při aktivaci benzylnalkoholů) [40].

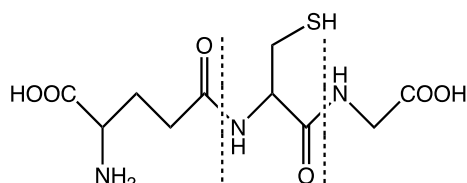
#### ***Acetylace***

Acetylace je významnou metabolickou cestou pro sloučeniny obsahující aminoskupinu (arylaminy, alifatické aminy, aminokyseliny, sulfonamidy, hydrazidy) [38]. *N*-Acetyltransferasa katalyzuje dvoukrokový přenos acetylové skupiny z donoru (acetyl-CoA) na aromatický amin. Tyto enzymy se vyskytují v mnoha tkáních a jsou složeny nejméně ze tří rodin isoenzymů [41].

#### ***Konjugace s glutathionem***

Glutathion-*S*-transferasa je důležitá pro svůj protektivní účinek proti chemickým

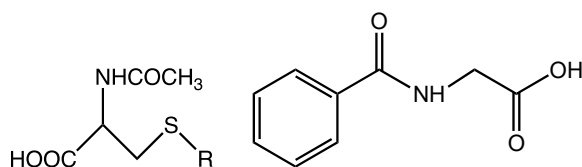
kancerogenům, jejím působením dochází k eliminaci některých kancerogenů působících přímo na DNA a díky tomu působí preventivně proti vzniku nádorového onemocnění. U některých látek však může při konjugaci s glutathionem (obr. 2.9) docházet naopak ke vzniku látek s kancerogenními účinky [38].



Obr. 2.9 Glutathion (jako tripeptid:  $\gamma$ -L-glutamyl-L-cysteinylglycin)

### ***Konjugace s glycinem a dalšími aminokyselinami***

Xenobiotika, která obsahují karboxylovou skupinu, jsou náchylná ke konjugaci s endogenními aminokyselinami. K této konjugaci dochází v jaterních mitochondriích. Volná karboxylová kyselina je aktivována reakcí s ATP následovanou reakcí s koenzymem A (CoA). Například karboxylová skupina benzoové kyseliny je aktivovaná za vzniku meziprojektu thioester CoA, který reaguje s primárním aminem glycinu za vzniku kyseliny hippurové (obr. 2.10). Glycin má historický význam v konjugaci xenobiotik, protože konjugace s ním je jednou z nejdříve objevených reakcí přiřazených k metabolismu xenobiotik. Keller v roce 1842 [41] sám užíval benzoovou kyselinu a poté izoloval a charakterizoval hlavní metabolit, kyselinu hippurovou, jako konjugát glycinu. Játra jsou hlavním místem glycinové konjugace a tato reakce byla využita pro testování funkce jater u lidí. Další aminokyseliny, například taurin, mohou být využity ke konjugaci alifatických, aromatických a heterocyklických karboxylových kyselin [41].

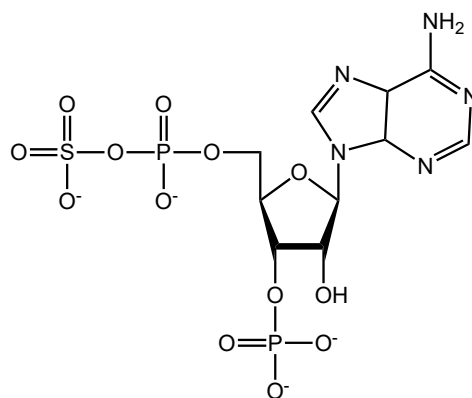


Obr. 2.10 Merkapturová a hippurová kyselina

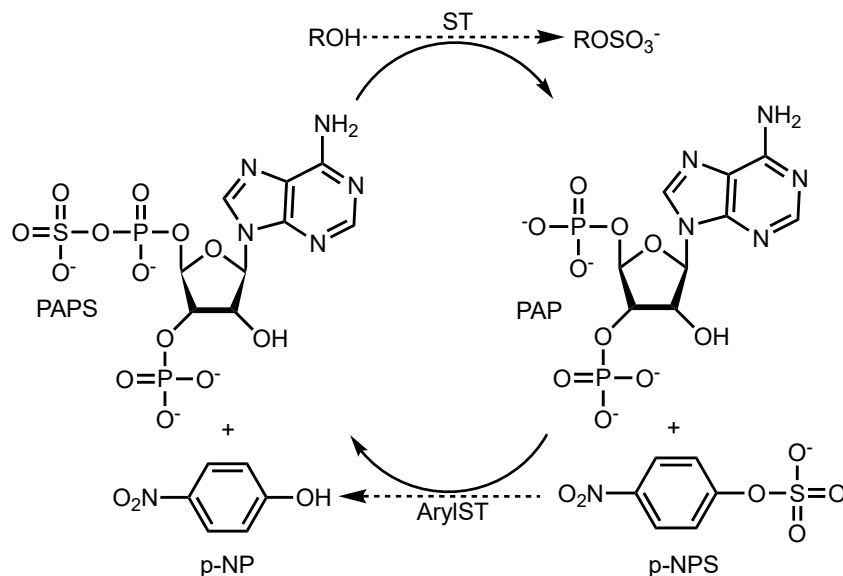
### ***Sulfatace***

Sulfatace je důležitou molekulární modifikací pro všechny organismy, které regulují

základní buněčné procesy. Hraje roli i v četných patologických procesech. Enzymy odpovědné za tuto reakci v živých organismech jsou sulfotransferasy (EC 2.8.2.-). Tyto enzymy katalyzují přenos sulfátové skupiny ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) z 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfátu (PAPS, viz Obr. 2.11) na hydroxyl a primární aminovou skupinu z různých akceptorů. U eukaryot byly popsány dvě skupiny sulfotransferas: membránové sulfotransferasy (STs) z Golgiho aparátu, které sulfatují velké molekuly jako jsou polysacharidy a proteiny, a cytosolová sulfotransferasa (SULTs), která přenáší sulfátovou skupinu z PAPS na fenoly, steroidy, hormony, aminy a xenobiotika. Druhá zmíněná skupina se jinak nazývá také fenol- nebo aryl sulfotransferasy (ArylST). Skupina PAPS-independentních sulfotransferas, popsány u bakterií, využívá dva arylové substráty, jeden jako donor sulfátové skupiny a druhý jako akceptor [42, 43]. STs jsou atraktivní jako biotransformační nástroj díky jejich schopnosti sulfatovat regio- a stereoselektivním způsobem. Nicméně, syntetické využití STs je omezeno kvůli vysoké ceně a nestabilitě PAPS a problémům s inhibicí produktu způsobenou 3'-fosfoadenosin-5'-fosfátem (PAP). K využití ArylST, zejména potkaní jaterní sulfotransferasy IV (Ast IV), pro sulfataci různých flavonoidů, steroidů, peptidů a alifatických alkoholů, byl vyvinut systém pro regeneraci PAPS, založený na reverzibilitě reakce katalyzované ArylST, která může přesunout sulfátovou skupinu z např. *p*-nitrofenylsulfátu (*p*-NPS) na PAP, aby zregeneroval PAPS *in situ* (viz Obr. 2.12) a překonal inhibici způsobenou PAP [17, 44]. Bakteriální arylsulfotransferasy (AST), např. enzym z *Desulfitobacterium hafniense*, jsou enzymy, které katalyzují přenos sulfátové skupiny z *p*-nitrofenyl sulfátu (*p*-NPS) na fenolickou molekulu akceptoru. Jejich další výhodou spočívá v poměrně snadné heterologní expresi v *E. coli* a tudíž možnosti připravit sulfatované metabolity ve velkém množství (až stovky mg) a čistotě [45].



Obr. 2.11 Strukturní vzorec 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfátu (PAPS)

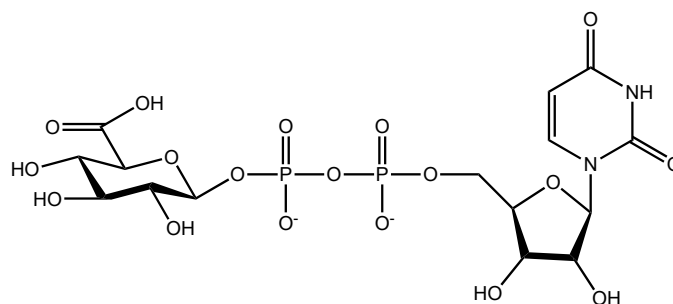


Obr. 2.12 Regenerace PAPS s použitím ArylST (převzato a upraveno [44])

### **Glukuronidace (konjugace s kyselinou glukuronovou)**

Hlavním konjugátem pro 2. fázi biotransformace u člověka a ostatních savců je  $\beta$ -D-glukuronid. Glukuronidace je typická také pro mnohé endogenní sloučeniny, například pro žlučové kyseliny [46]. Glukuronidy jsou produkovány jaterním mikrosomálním enzymem, uridin 5'-difosfoglukuronyl transferasou (UDPGT, EC 2.4.1.17) přemístěním glukuronylového zbytku z uridin 5'-difosfoglukuronové kyseliny (UDPGA, viz obr. 2.13). Glukuronidy jsou středem zájmu z mnoha důvodů. Glukuronosylové deriváty různých xenobiotik jsou hodnotné jako standardy k analýze moči nebo krevních vzorků pro testy na drogy nebo testy na působení pesticidů. Většina xenobiotik v biologickém vzorku, zejména ve vzorcích moči, bývá ve formě metabolitu. Glukuronidy a další metabolity jsou také důležité ve studiích metabolismu nových léků, protože vznikající metabolity mohou mít toxické nebo jiné nežádoucí účinky. Deriváty glukuronidů farmakologicky aktivních sloučenin se tak mohou chovat jako proléčiva; aktivní složka je uvolněna endogenními glukuronidasami na požadovaném místě účinku. Glukuronidy z fluorogenních složek mohou být využity v testech na bakteriální kontaminaci v potravinách. Také mnoho sensorických složek např. mléka, včetně 4-methylfenolu, se vyskytují jako deriváty glukuronidů [35].





Obr. 2.13 UDP-glukuronová kyselina

### 2.3 Metabolismus flavonoidů

Biologické vlastnosti polyfenolů závisejí na jejich biodostupnosti a biotransformaci. Nepřímým důkazem absorpce parentních polyfenolů nebo jejich metabolitů do cirkulace je zvýšení antioxidační kapacity plazmy po konzumaci jídel bohatých na polyfenolové sloučeniny. Mnohem jasnější důkazy však byly získány měřením koncentrace těchto látek v plazmě a moči po požití čistých složek nebo potravin se známým množstvím složky, která byla zkoumána. Chemická struktura polyfenolů určuje jejich míru střevní absorpce a metabolity cirkulující v plazmě [47]. Některé polyfenoly jsou metabolizovány již v gastrointestinálním traktu. Aglykony a volné jednoduché fenolické sloučeniny, flavonoidy (kvercetin) a fenolové kyseliny, mohou být absorbovány rovnou sliznicí tenkého střeva [7]. Prvním krokem metabolismu flavonoidů je deglykosylace jejich glykosidů, která probíhá většinou v tenkém střevě (s několika výjimkami – např.  $\alpha$ -L-rhamnosidy), případně až působením enzymů střevní mikroflóry. Po absorpci jsou flavonoidy navázány na albumin a transportovány portální žílou do jater. Játra se zdají být hlavním orgánem metabolisujícím flavonoidy (důležitou roli však stále hrají také střevní sliznice a ledviny). Flavonoidy a jejich deriváty podléhají hydroxylacím, methylocím a redukším [14]. Fenolové sloučeniny jsou snadným cílem pro konjugační reakce, které jsou ve skutečnosti hlavní biotransformační cestou vedoucí k jejich exkreci z lidského těla [37]. Konjugační reakce s kyselinou glukuronovou a/nebo sulfátem se zdají být nejčastější metabolickou cestou flavonoidů. Například glukuronidace flavonolů se probíhá působením lidských jaterních mikrosomů (laboratorně připravená buněčná frakce, tvořená hladkým endoplazmatickým retikulem a obsahující mj. UDPGT-1A9) a jater a UDPGT hraje důležitou roli v tomto procesu [14].

Např. většina silybinu přítomna v plazmě je po podání v konjugované formě, zejména

---

sulfátů a glukuronidů. U methoxy skupiny na C-19 u silybinu bylo zjištěno, že podléhá *O*-demethylaci lidským cytochromem P450 2C8. Silybin může být glukuronován na C-7 OH a C-20 OH skupinách lidskými UDP-glukuronosyltransferasami (UGTs) 1A a 2B, také sulfatované metabolity byly nalezeny v lidské plazmě. Použitím krysích jater byla také pozorována tvorba sulfatovaných a glukuronidovaných konjugátů silychristinu a silydianinu, ale přesné struktury (regioisomery) metabolitů zůstávají neznámé vzhledem k chybějícím kompletním spektrálním datům (NMR) [21].

Glukuronidy i sulfáty flavonoidů jsou polární, tedy ve vodě dobře rozpustné sloučeniny, které živočichové snadno vylučují močí a žlučí. Pokud jsou vylučovány žlučí, flavonoidy procházejí do duodena a jsou metabolizovány střevními bakteriemi, což vede k produkci fragmentovaných produktů a/nebo hydrolýze glukurono- nebo sulfokonjugátů. Výsledné metabolity jsou reabsorbovány a vstupují do enterohepatálního cyklu [14].

---

## 3 Experimentální část

### 3.1 Pomůcky a přístroje

- automatizovaný sběrač frakcí Super Frac (Pharmacia Biotech, USA)
- centrifugy Model J-6B (Beckman Centrifuge, Centrifuge 5804 R) a miniSpin plus (Eppendorf, Německo)
  - čerpadla mobilní fáze LC-20AD
  - degaser DGU-20A
  - detektor s diodovým polem SPD-M20A
- HPLC - Shimadzu Prominence System (Shimadzu, Kyoto, Japonsko), software Shimadzu Solution při frekvenci 40 Hz a časové konstantě detektoru 0,025 sekund
- hybridní hmotnostní spektrometr LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) s ionizací elektrosprejem
  - chladicí autosampler SIL-20AC
  - kolonový termostat CTO-10AS
- lyofilizátor Lyovac GT 2 (Leybold, USA)
- odparka Rotavapor R-200 (Büchi, Švýcarsko) s vakuovou pumpou a jednotkou pro kontrolu podtlaku při teplotě 40 °C
- spektrofotometr Tecan Sunrise (Tecan Group Ltd., Männerdorf, Švýcarsko) s programem Magellan
- spektrofotometr UVmini-1240 (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)
- termostatovaná třepačka s chlazením KS 4000 ic control (IKA, Staufen, Německo)
- termostatovaná třepačka Thermomixer compact (Eppendorf, Německo)

### 3.2 Chemikálie

- 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl (DPPH, čistota min. 95 %. Sigma-Aldrich, Praha)
- alamethicin (čistota min. 90 %, Cayman chemical company, Neratovice)
- dodecylsírán sodný (SDS, čistota min. 99 %, p.a., Lachner, ČR)
- ethylacetát (ethylester kyseliny octové, čistota min. 99,7 %, p.a., Lachner, ČR)
- Folin-Ciocalteuovo činidlo (109001, Merck, Německo)
- hovězí sérový albumin (BSA, čistota min. 95 %, Sigma-Aldrich, Praha)

- 
- isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG, čistota min. 99 %, Sigma-Aldrich, Praha)
  - kanamycin (KNM, kanamycin sulfát, SERVA Electrophoresis GmbH, Německo)
  - kit pro stanovení zhášení ABTS (CS0790, Sigma-Aldrich, Praha)
  - kyselina 2-thiobarbiturová (TBA, čistota min. 99 %, Merck, Německo)
  - gallová kyselina (čistota min. 99 %, Lachema, Brno)
  - kyselina chlorovodíková (HCl, 37 %, čistota min. 99,99 %, CertiPUR, Merck spol. s.r.o., Německo)
  - kyselina trichloroctová (TCA, čistota min. 99 %, p.a., Lachner, ČR)
  - $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  (čistota min. 99 %, Lachema, Brno)
  - *p*-nitrofenylsulfát (*p*-NPS, čistota min. 99 %, Acrós organics, New Jersey, USA)
  - *t*-butyl hydroperoxid (TBH, 70% roztok wt ve vodě, Sigma-Aldrich, Praha)
  - tetracyklin (TCK, tetracyklin HCl, SERVA Electrophoresis GmbH, Německo)
  - tetramethylethylendiamin (TEMED, čistota min. 99 %, Merck, Německo)
  - tris(hydroxymethyl)aminomethan (čistota min. 99,8 %, Sigma-Aldrich, Praha)
  - UDP-glukuronová kyselina (UDPGA, čistota 98-100 %, Sigma-Aldrich, Praha)
  - uhličitan sodný ( $Na_2CO_3$ , čistota min. 99 %, Fichema, ČR)

### 3.3 Biologický materiál

- Kompetentní buňky *Escherichia coli* BL21(DE3) Gold
- Lidské jaterní mikrosomy (HLM) z Ústavu lékařské chemie a biochemie LF UP Olomouc
- Plasmid obsahující gen pro AST z *D. hafniense* (dar dr. van der Horsta, University of Amsterdam, Holandsko)
- Potkaní jaterní mikrosomy (kat. č. M9066) od firmy Sigma-Aldrich (Praha, ČR)

### 3.4 Roztoky

#### Fosfátový pufr PBS

- 10 $\times$  koncentrovaný zásobní roztok PBS: NaCl (0,137 M), KCl (2,68 mM),  $Na_2HPO_4$  (8,96 mM),  $KH_2PO_4$  (1,47 mM)

- 
- ve všech experimentech byl tento zásobní roztok 10× ředěn destilovanou vodou

### **TBA-TCA**

- 3,75 g kyseliny thiobarbiturové a 180 g kyseliny trichloroctové bylo rozpuštěno v 800 ml H<sub>2</sub>O (zahřívání), přidáno 20,72 ml 37% HCl; objem doplněn do 1000 ml destilovanou vodou

### **Luria-Bertani (LB) medium**

- Trypton (10 g), kvasničný extrakt (5 g), NaCl (5 g)
- pomocí NaOH úprava na pH 7
- doplnění destilovanou vodou do 1000 ml

### **Tris-Glycinový pufr**

- Tris-báze (3,03 g), glycin (1,877 g)
- pomocí HCl úprava na pH 8,9
- doplnění vodou do 250 ml, výsledná koncentrace 100 mM

### **Roztoky pro SDS-PAGE**

#### **Migrační pufr**

- Tris-Gly: (25 mM Tris, 250 mM glycin, 0,1% SDS), pH 8,8

#### **Migrační gel**

- 12% SDS polyakrylamidový gel 5 ml: 30% roztok akrylamidu/bisakrylamidu 29:1 (2,0 ml), deionizovaná voda (1,6 ml), pufr Tris-Cl (1,5 mM, pH 8,8; 1,3 ml), 10% dodecylsírán sodný (0,05 ml), 10% peroxodisírán amonný (0,05 ml), tetramethylethylendiamin (0,002 ml)

---

### **Vzorkový pufr**

- 5× koncentrovaný zásobní roztok Tris-Cl 250 mM Tris-Cl, 500 mM dithiotreitol, 10% SDS, 0,5% bromfenolová modř, 50% glycerol

### **Zaostřovací gel**

- 5% polyakrylamidový gel 1 ml: 30% roztok akrylamidu/bisakrylamidu 29:1 (0,17 ml), deionizovaná voda (0,63 ml), pufr Tris-Cl (50 mM, pH 6,8; 0,13 ml), 10% dodecylsírán sodný (0,01 ml), 10% peroxodisírán amonný (0,01 ml), tetramethylethylendiamin (0,001 ml).

## **3.5 Příprava flavonolignanů**

Silymarin byl zakoupen od firmy Liaoning Senrong Pharmaceutical Co., Ltd. (Pchan-ťin, Čínská lidová republika, šarže č. 120501). Silybin byl izolován ze suspenze silymarinu v methanolu filtrací, 2,3-dehydrosilybin (DHSB) byl připraven ze silybinu oxidací dle dříve popsané procedury [48]. Silychristin (SCH) byl izolován ze silymarinu po odstranění silybinu, který byl nanesen na kolonu LH-20, na které byla provedena opakovaná chromatografie s použitím methanolu jako mobilní fáze při 40 °C pro získání SCH o čistotě >95 % [49]. 2,3-Dehydrosilychristin (DHSCH) byl připraven oxidací silychristinu dle [10].

## **3.6 Příprava sulfátů flavonolignanů**

Sulfáty vybraných flavonolignanů byly připraveny pomocí arylsulfotransferasy z *Desulfitobacterium hafniense* heterologně exprimované v *E. coli* [42].

### **Příprava LB média**

Tuhý LB agar (LBA) se nejprve rozeřál na elektrické plotýnce. Do 100 ml LBA bylo sterilně přidáno 100 µl kanamycinu (KNM) a 250 µl tetracyklinu (TCK). Asi 25 ml LBA bylo rovnoměrně nalito na misky a necháno ve sterilních podmínkách ztuhnout (asi 1 hodinu).

---

### ***Transformace***

Mikrozkumavky s plazmidem (-20°C) a buňkami *E. coli* BL21 (de3) Gold (1 mikrozkumavka, -80°C) se nechaly pomalu rozmraznout na ledu. Do 100 µl buněk *E. coli* bylo přidáno 2 µl plazmidu a po smíchání následovala inkubace 20 minut na ledu. Mezitím se předešlo LB médium (bez ATB) na 42 °C. Směs plazmidu s buňkami se inkubovala 1 minutu při 42 °C a poté se dala na 2 minuty na led. Následně bylo přidáno 700 µl předešlého LB média a směs se nechala 1-1,5 hodiny inkubovat při 37 °C. Kultura se po 50 µl nanosila na Petriho misky s KNM a TCK a přes noc se nechaly narůst kolonie. Potom se sterilním párátkem vypíchlo 3-6 kolonií, které se daly do LB média s KNM (100 µl) a TCK (250 µl) a nechaly narůst do  $OD_{600} = 0,6$  při 37 °C na třepačce. Poté se jejich exprese indukovala přidávkem IPTG (4 mM, 160 µl) přes noc při 25 °C. Nejlepší kolonie byly vybrány pro přípravu kryokonzervy. Zaočkovalo se 100 ml LB média s KNM a TCK příslušnou kolonií a kultura se nechala narůst přes noc při 37 °C. Do narostlé kultury bylo následně přidáno 10 ml glycerolu (10 %) a vzniklá suspenze byla rozdělena do sterilních mikrozkumavek (à 500 µl), zmrazena v tekutém dusíku a uchována při -80 °C po dobu maximálně 6 měsíců.

### ***Příprava enzymu***

Ke 100 ml LB média bylo přidáno 100 µl kryokonzervy, 100 µl KNM a 250 µl TCK a směs byla inkubována při 37 °C na třepačce do  $OD_{600} = 0,6$ . Poté se jejich exprese indukovala přes noc na třepačce při 25°C přidávkem IPTG (4 mM, 160 µl do 100 ml). Další den se centrifugovalo (5000×g, 20 minut) a buněčný sediment byl resuspendován v Tris-glycinovém pufru (100 mM, pH 8,9). Suspenze se poté sonikovala 4×4 minuty na ledu. Následně se opět provedla centrifugace (5000×g, 20 minut) a supernatant byl použit do enzymových reakcí.

### ***Stanovení aktivity enzymu***

Do jamky mikrotitrační destičky bylo pipetováno 144 µl Tris-glycinového pufru (100 mM, pH 8,9), 3 µl DTT, 30 µl naftolu, 30 µl *p*-NPS a 120 µl enzymu. Následně byla změřena absorbance při 400 nm a aktivita enzymu určena podle vzorce (3.1).

Vzorec pro výpočet aktivity enzymu

$$a = \frac{\Delta A \cdot X \cdot F}{\Delta t \cdot \varepsilon \cdot d \cdot x} \quad (3.1)$$

$\Delta A/\Delta t$  – změna absorbance [ $\text{min}^{-1}$ ],  $X$  – celkový objem [ $\mu\text{l}$ ],  $F$  – ředění,  $\varepsilon$  – molární absorpční koeficient [ $\text{ml} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ],  $d$  – šířka jamky [ $\text{cm}$ ],  $x$  – objem enzymu [ $\mu\text{l}$ ]

### ***Příprava sulfátů***

Substrát (200 mg) byl rozpuštěn v 5 ml acetonu, bylo přidáno *p*-NPS (>25 mg/ml, v 5 ml Tris-glycinového pufru), 24 ml pufru a 2 ml enzymu, směs byla probublána argonem (inertní atmosféra) a při 30 °C byla inkubována v baňkách uzavřených zátkou se septem minimálně 4 hodiny na třepačce (100 rpm). Nakonec byla reakční směs krátce povařena (propíchlá se zátka a baňka byla ponořena do vařící vody) a po ochlazení byla uchovávána při -20 °C až do purifikace.

### ***Studie časového průběhu sulfatace***

Při sulfataci testovaných látek byla provedena 12 hodinová kinetická studie. Po hodině byly odebírány cca 100  $\mu\text{l}$  alikvoty, které se zahřály na 95 °C a uchovaly při -20 °C, než byly analyzovány metodou HPLC.

### ***Purifikace***

V první fázi byla reakční směs sulfátů odpařena na rotační vakuové odparce na asi poloviční objem pro dokonalé odpaření acetonu. Kyselinou mravenčí bylo následně upraveno pH na 7,5-7,7. Poté byla směs třikrát extrahována ethylacetátem. Vodná fáze byla odpařena do sucha, rozpuštěna v 5 ml 80% methanolu a centrifugována (5000 $\times$ g, 2 min). Nakonec byl čirý supernatant nanesen na kolonu Sephadex LH-20 v 80% methanolu a rozdělena pomocí 80% methanolu jako mobilní fáze. Jednotlivé frakce byly kontrolovány pomocí TLC (mobilní fáze - ethylacetát/methanol/kyselina mravenčí – 4/1/0,01 (v/v/v)) a HPLC. V posledním kroku se frakce odpařily a lyofilizovaly.

Frakce, které nesplňovaly dostatečnou čistotu (< 90%), byly znovu přečištěny. Nejprve byly rozpuštěny ve vodě (případně s přidavkem NaOH) a naředěny methanolem. Poté byly opět naneseny na kolonu LH-20.



Pro další experimenty byly použity vzorky o čistotách, které jsou uvedeny v tab. 3.1.

Tab. 3.1 – Čistoty použitých vzorků pro experimenty

vzorek	čistota (%)
DHSBS	95,5
DHSBSS	100
SCHS	98
DHSCHS	99,5

**2,3-Dehydrosilybin-20-O-sulfát** (DHSBS) byl získán ve formě žluté pevné látky (22 mg, 9,4% výtěžek, čistota 90 %). Jeho struktura byla určena pomocí HRMS ( $m/z$  pro  $C_{25}H_{19}O_{13}S$  vypočten 559,05518, nalezen 559,05454, viz obr. 4.4) a  $^{13}C$ ,  $^1H$  NMR (viz tab. 4.1) Komplettní přiřazení NMR signálů bylo dosaženo použitím kombinace gCOSY, gHSQC, gHMBC.

Struktura **2,3-dehydrosilybin-7,20-O-disulfátu** (DHSBSS, 31 mg, 11,6% výtěžek, čistota 99 %) byla určena pomocí HRMS ( $m/z$  pro  $C_{25}H_{19}O_{16}S_2$  vypočten 639,01200, nalezen 639,01115, viz obr. 4.5) a  $^{13}C$ ,  $^1H$  NMR (viz tab. 4.2).

**Silychristin-19-O-sulfát** byl získán jako žlutá pevná látka (SCHS, 75 mg, 32,3% výtěžek, čistota 99,5 %). Jeho struktura byla určena podle HRMS ( $m/z$  pro  $C_{25}H_{20}O_{13}S$  vypočten 559,05518, nalezena 559,05526, viz obr. 4.6) a  $^{13}C$ ,  $^1H$  NMR (viz tab. 4.3).

**2,3-Dehydrosilychristin-19-O-sulfát** (DHSCHS) byl získán jako vedlejší produkt sulfatace silychristinu ve formě žlutohnědé pevné látky (2,1 mg, 0,9% výtěžek, čistota 96 %). Jeho struktura byla určena pomocí HRMS ( $m/z$  pro  $C_{25}H_{20}O_{13}S$  vypočtena 559,05518, nalezena 559,05526, viz obr. 4.7) a  $^{13}C$ ,  $^1H$  NMR (viz tab. 4.4).

### 3.7 Příprava glukuronidů flavonoidů

Tris-HCl pufr (204 ml, 100 mM, pH 7,4),  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  (212 mg, 5 mM), UDPGA (108 mg, 0,8 mM), BSA (1,05 g, 0,5 % w/v), silychristin (40 mg v 1,7 ml DMSO, 0,4 mM), alamethicin (8 mg v 0,4 ml DMSO) a HLM (1,1 ml suspenze o 44,56 mg/ml) bylo smícháno a inkubováno na třepače (37°C, 100 rpm). Každou hodinu byly odebírány

aliquoty (50  $\mu$ l) pro analýzu průběhu tvorby glukuronidů. V páté hodině bylo odebráno 100 ml z celkového objemu, krátce se povařil a zamrazil. Zbytek se nechal dále inkubovat po celkovou dobu 24 hodin a následně se také povařil a zamrazil.

### ***Studie časového průběhu tvorby glukuronidů***

Pro glukuronidaci silychristinu byla provedena 24 hodinová studie časového průběhu reakce. Prováděly se dvě série reakcí. V jedné z nich se měnila koncentrace UDP-glukuronátu (0,8 mM; 4 mM a 8 mM) a v druhé koncentrace HLM (0,25 mg/ml; 0,5 mg/ml a 1 mg/ml). Každou hodinu se odebíraly aliquoty (100  $\mu$ l) pro analýzu HPLC, které se ihned po odběru zahřály na 95 °C a zamrazilily (-20 °C) do doby, než byla provedena analýza.

## **3.8 Charakteristika sulfátů (struktura a čistota)**

Stanovení struktury a čistoty studovaných látek bylo provedeno pomocí měření HRMS, NMR a HPLC.

### **HRMS**

Vzorky byly nejprve rozpuštěny v methanolu a poté byly zavedeny do průtoku mobilní fáze (methanol/voda 4/1; 100  $\mu$ l/min) se smyčkou (2  $\mu$ l). Během analýzy bylo napětí vstřikování 4,0 kV, napětí kapiláry -16 V a kapilární teplota 275 °C.

### **NMR**

Vzorky byly měřeny na přístroji Bruker Avance III 600 MHz (600,23 MHz pro  $^1\text{H}$ , 150,94 MHz pro  $^{13}\text{C}$ , DMSO- $d_6$ , 30 °C). Hodnoty chemického posunu jsou uvedené v  $\delta$  [ppm], interakční konstanty jsou odečteny analýzou I. řádu a jsou uvedeny jako  $J$  [Hz]. Přiřazení jednotlivých atomů bylo provedeno analýzou 2D spekter. Jako interní standardy byly použity signály rozpouštědel (DMSO:  $\delta\text{H}$  2,500 ppm,  $\delta\text{C}$  39,60 ppm; CD<sub>3</sub>OD:  $\delta\text{H}$  3,330 ppm,  $\delta\text{C}$  49,30 ppm). NMR experimenty:  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, gCOSY, gHSQC, a gHMBC byly provedeny za použití softwaru od výrobce.

---

HPLC

Separace sulfátů byla provedena na koloně Chromolith RP-18e (100 × 3 mm, Merck, Německo) s předkolonou (4,6 × 5 mm, Merck, Německo) a gradientem mobilní fáze acetonitril/voda/kyselina mravenčí (5/100/0,1, v/v/v, fáze A) a acetonitril/voda/kyselina mravenčí (80/100/0,1, v/v/v, fáze B, viz tab. 3.2 a 3.3), průtoková rychlost mobilní fáze 1,2 ml/min.

Detekce byla monitorována v rozmezí 200-400 nm, analyzována byla při vlnové délce 285 nm.

Tab. 3.2 – Gradient mobilní fáze pro analýzu DHSB

čas (min)	MF A* (%)	MF B** (%)
0	80	20
0-6	60	40
6-10	20	80
10-11	80	20
11-13	80	20

\*acetonitril/voda/kyselina mravenčí (5/100/0,1, v/v/v)

\*\*acetonitril/voda/kyselina mravenčí (80/100/0,1, v/v/v)

Tab. 3.3 – Gradient mobilní fáze pro analýzu SCH a DHSCH

čas (min)	MF A* (%)	MF B** (%)
0-5	100-75	0-25
5-8	75-40	25-60
8-10	40	60
10-11	40-100	60-0

\*acetonitril/voda/kyselina mravenčí (5/100/0,1, v/v/v)

\*\*acetonitril/voda/kyselina mravenčí (80/100/0,1, v/v/v)

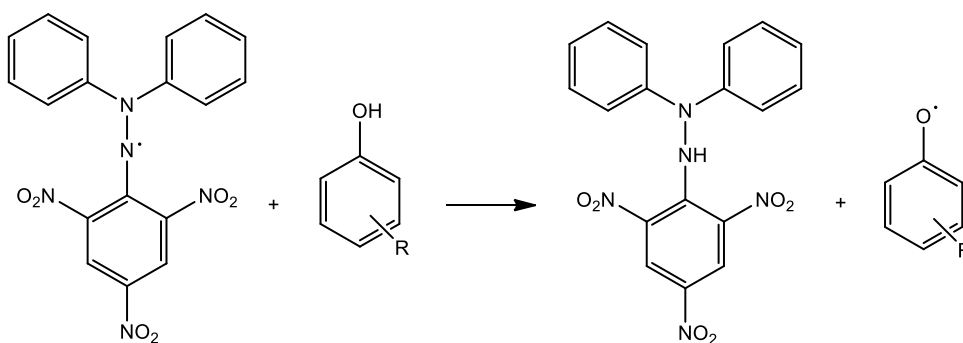
### 3.9 Antiradikálové a antioxidační testy

Bylo provedeno několik testů na stanovení antioxidační a antiradikálové aktivity testovaných látek (2,3-dehydrosilybin, silychristin, 2,3-dehydrosilychristin a jejich příslušné sulfáty). Všechny zásobní roztoky (100 mM) testovaných látek byly připraveny v DMSO a dále ředěny podle příslušných testů.

### 3.9.1 Zhášení 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylového radikálu

Jedním z testů zkoumající antioxidační aktivitu látek bylo zhášení DPPH radikálu, při kterém se původně fialově zbarvený stabilní radikál mění na bezbarvý produkt (obr. 3.1).

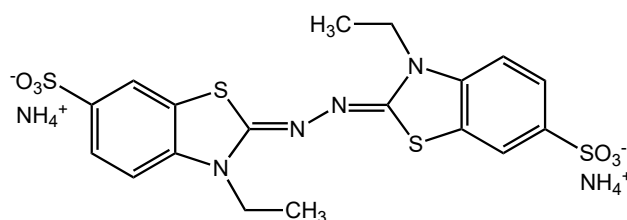
Vzorky byly ředěny geometrickou řadou 1,5× následujícím způsobem: Do poslední jamky mikrotitrační destičky bylo pipetováno 300  $\mu\text{l}$  vzorku, do ostatních 100  $\mu\text{l}$  PBS pufru. Z poslední jamky se převádělo vždy 200  $\mu\text{l}$  (s výjimkou jamky první, tam zůstal jen čistý pufr). Potom bylo pipetováno 15  $\mu\text{l}$  vzorku v kvadrupletu, do tří sloupců bylo přidáno 285  $\mu\text{l}$  DPPH a do čtvrtého 285  $\mu\text{l}$  methanolu (sloužila pro stanovení absorbance pozadí). Výsledná koncentrace vzorků v reakční směsi byla pro DHSB 0 - 25  $\mu\text{M}$ , DHSBS 0 - 35  $\mu\text{M}$ , DHSBSS 0 - 500  $\mu\text{M}$ , SCH 0 - 100  $\mu\text{M}$ , DHSCH 0 - 15  $\mu\text{M}$ , DHSCHS 0 - 15  $\mu\text{M}$ ). Po 30 minutách byla změřena absorbance reakční směsi při 517 nm na readeru a z grafické závislosti absorbance na koncentraci byla určena hodnota koncentrace, která snížila absorbanci DPPH radikálu na polovinu ( $\text{IC}_{50}$ ).



Obr. 3.1 Mechanismus zhášení DPPH radikálu

### 3.9.2 Zhášení radikálu 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové kyseliny)

Zhášení ABTS<sup>•+</sup> radikálu (viz obr. 3.2) bylo stanoveno kitem KF-01-002 (Bioquochem). Připravil se roztok ABTS a standard vitamínu C, který se ředil do mikrozkušavek ultračistou vodou. Do každé jamky mikrotitrační destičky bylo přidáno 5  $\mu$ l standardu nebo vzorku (koncentrace všech vzorků byla 500  $\mu$ M, kromě SCH 250  $\mu$ M) a poté 200  $\mu$ l zředěného roztoku ABTS. Směs se nechala třepat 4 minuty a nakonec se změřila absorbance na readeru při 700 nm. Antioxidační aktivita byla vyjádřena jako ekvivalent vitamínu C (CE).



Obr. 3.2 ABTS<sup>•+</sup> radikál

### 3.9.3 Redukce Folin-Ciocalteuova činidla

Do mikrozkušavek byl nejprve ředěn standard (gallová kyselina). Do první jamky bylo pipetováno 5  $\mu$ l PBS pufru, do ostatních 5  $\mu$ l standardu - vždy v tripletu. Do dalších jamek bylo opět v tripletu pipetováno 5  $\mu$ l vzorků (DHS, SCH, DHSCH a jejich sulfáty). Poté bylo do všech jamek pipetováno 100  $\mu$ l Folin-Ciocalteuova činidla a nechalo se 5 minut stát. Následně se do všech jamek pipetovalo 100  $\mu$ l uhličitanu sodného a reakční směs se nechala 90 minut inkubovat při laboratorní teplotě. Nakonec se změřila absorbance při 700 nm na readeru a aktivita byla vyjádřena jako ekvivalenty gallové kyseliny (GAE).

### 3.9.4 Inhibice peroxidace lipidů

Komerční mikrosomy se pětkrát promyly v PBS pufru. Do mikrozkušavek bylo pipetováno 50  $\mu$ l roztoku testované látky v PBS pufru (koncentrace DHSB 0-100  $\mu$ M, DHSBS 0-100  $\mu$ M, DHSBSS 0-120  $\mu$ M, SCH 0-100  $\mu$ M, SCHS 0-120  $\mu$ M, DHSCH 0-1000  $\mu$ M, DHSCHS 0-100  $\mu$ M), 400  $\mu$ l zásobní suspenze potkaních mikrosomů

(0,625 mg/ml) a 50  $\mu$ l roztoku TBH (10 mM, 6,9  $\mu$ l 70% TBH na 5 ml PBS). Jako slepý vzorek byla připravena směs 400  $\mu$ l mikrosomů a 100  $\mu$ l PBS pufru. Do pozitivní kontroly bylo pipetováno místo vzorku 50  $\mu$ l PBS pufru. Všechny mikrozkušavky byly připraveny v tripletu. Poté se směs inkubovala 1 hodinu při 37°C na termostatované třepačce. Po inkubaci bylo do všech mikrozkušavek přidáno 700  $\mu$ l ledového roztoku TBA-TCA a potom se všechny mikrozkušavky zahřívaly 15 minut na termostatované třepačce při 95°C. Následně se nechaly při laboratorní teplotě zchladnout a byly centrifugovány 10 minut (3500 otáček/min). Nakonec se z každé mikrozkušavky pipetovalo 200  $\mu$ l na mikrotitrační destičku (v tripletu) a na readeru se změřila absorbance při 535 nm. Aktivita byla vyjádřena jako hodnoty IC<sub>50</sub>, určené z grafické závislosti inhibice lipoperoxidace na koncentraci testované látky.

### 3.9.5 Test schopnosti redukovat železité ionty

Antioxidační aktivita byla stanovena také pomocí komerčního kitu FRAP KF-01-003 (Bioquochem). Nejprve se připravil FRAP pracovní roztok a FRAP standard. Do mikrozkušavek se poté ultračistou vodou naředil standard (Fe<sup>3+</sup>). Do každé jamky mikrotitrační destičky se pipetovalo 10  $\mu$ l standardu a vzorku (koncentrace testovaných látek - DHSB 100  $\mu$ M, DHSBS 100  $\mu$ M, DHSBSS 100  $\mu$ M, SCH 100  $\mu$ M, SCHS 1000  $\mu$ M, DHSCH 1000  $\mu$ M, DHSCHS 100  $\mu$ M). Následně se do všech jamek přidalo 220  $\mu$ l FRAP pracovního roztoku a směs se nechala třepat 4 minuty. Nakonec se na readeru změřila absorbance při 593 nm.

### 3.9.6 Zhášení *N,N*-dimethyl-*p*-fenylendiaminového radikálu

Zhášení DMPD<sup>+</sup> radikálu bylo měřeno pomocí kitu DMPD KF-01-001 (Bioquochem). Nejdříve byl připraven standard a DMPD roztok. Standard byl naředěn do mikrozkušavek. Poté se do mikrotitrační destičky pipetovalo 20  $\mu$ l standardu a vzorků (koncentrace všech testovaných látek byla 100  $\mu$ M) a přidalo se 280  $\mu$ l DMPD roztoku. Směs se nechala třepat 10 minut při pokojové teplotě a následně byla změřena absorbance při 553 nm. Antioxidační aktivita byla vyjádřena jako ekvivalenty troloxu (TE).

### 3.10 Statistické zpracování výsledků

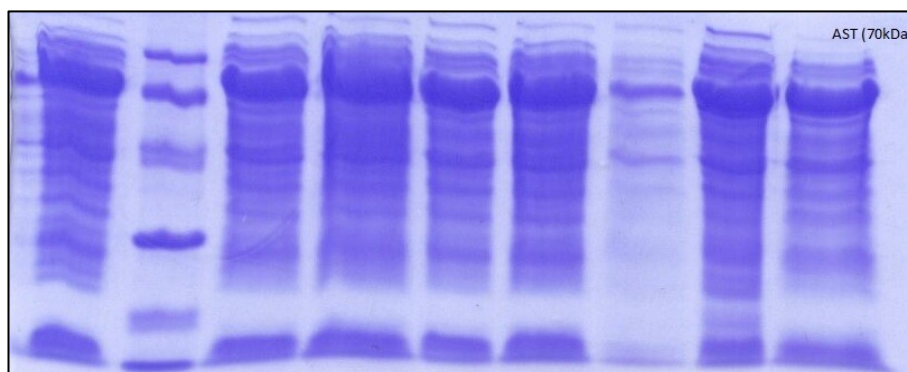
Testy antioxidační aktivity byly vždy provedeny minimálně ve třech nezávislých experimentech v tripletu. Všechna data byla analyzována testy ANOVA, Scheffé a metodou nejmenších čtverců pro *post hoc* analýzu pomocí statistického programu Statex verze 2.1 (Statex LLC, Wayne, New Jersey, USA). Rozdíly byly považovány za statisticky významné, pokud bylo  $p < 0,05$ .

## 4 Výsledky a diskuse

### 4.1 Sulfáty

#### 4.1.1 Stanovení enzymu a jeho aktivity

Před každou sulfatací byla u buněčného lyzátu provedena SDS-elektroforéza pro kontrolu aktivity enzymu (viz obr. 4.1) s nízkomolekulárním standardem (AST, 70 kDa). Dále byla stanovena sulfotransferasová aktivita s použitím 2-naftolu jako substrátu, která dosahovala reprodukovatelných hodnot  $229 \pm 40$  U/ml.

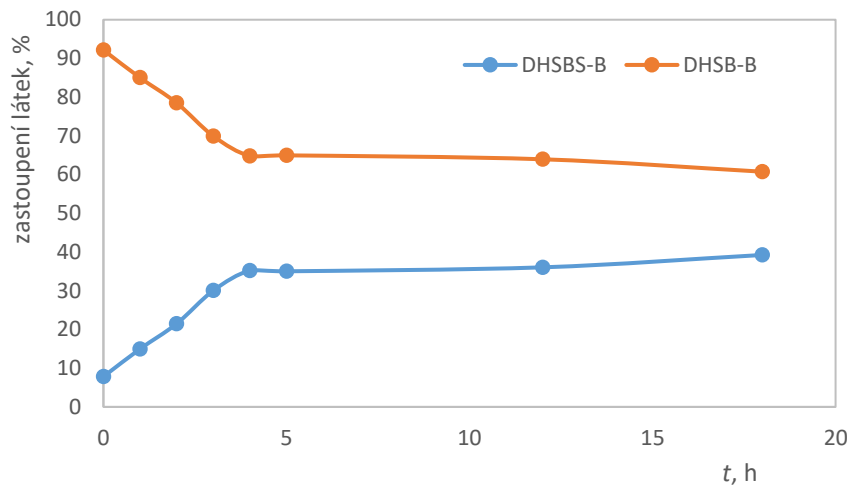


Obr. 4.1 SDS-elektroforéza pro stanovení aktivity enzymu

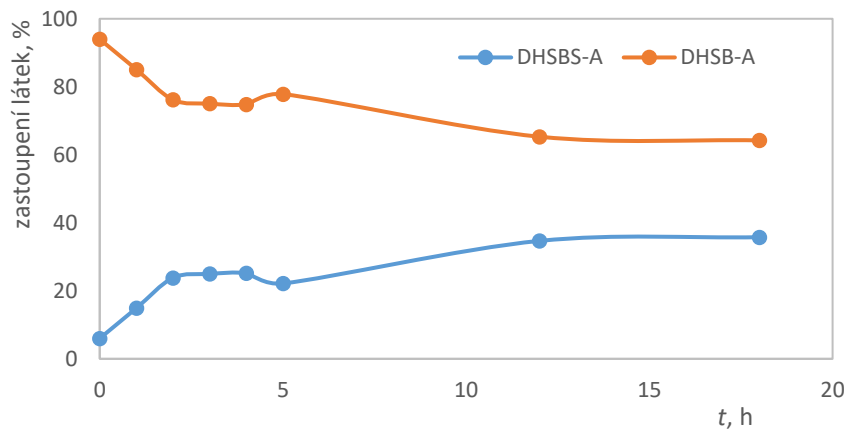
#### 4.1.2 Studie časového průběhu vzniku sulfátů

U 2,3-dehydrosilybinu byla provedena kinetická studie sulfatace v závislosti na čase (0-18 h). Na základě této studie bylo zjištěno, že DHSBS se tvoří již v první hodině sulfatace, přičemž DHSB-B (obr. 4.2) je sulfatován rychleji, než DHSB-A (obr. 4.3). Vzhledem k tomu, že konverze nebyla úplná, jsou přítomny i výchozí látky (DHSB a *p*-NPS, obr. 4.4). Jako vedlejší produkt této reakce vzniká také *p*-NP.

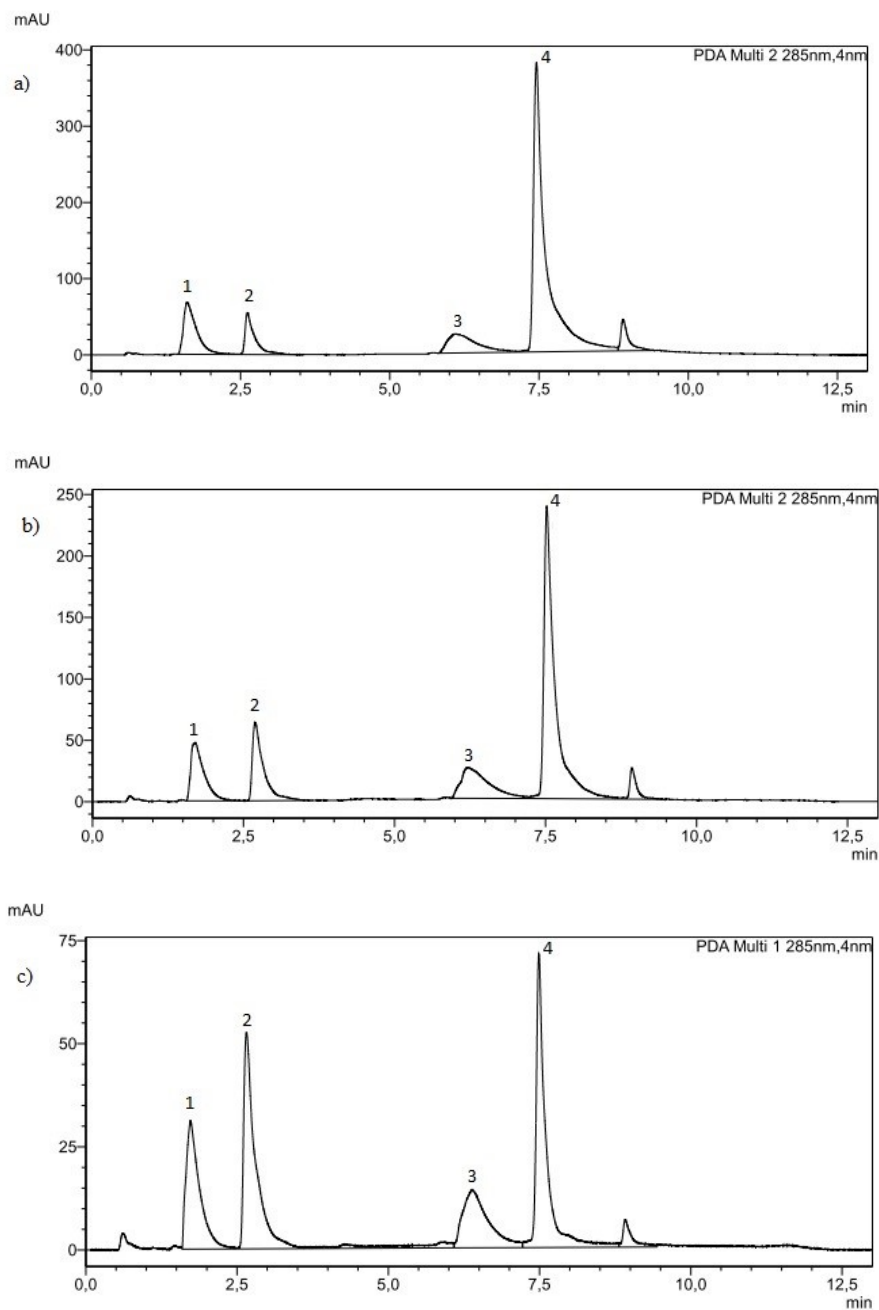




Obr. 4.2 Průběh sulfatace DHSB-B v čase



Obr. 4.3 Průběh sulfatace DHSB-A v čase



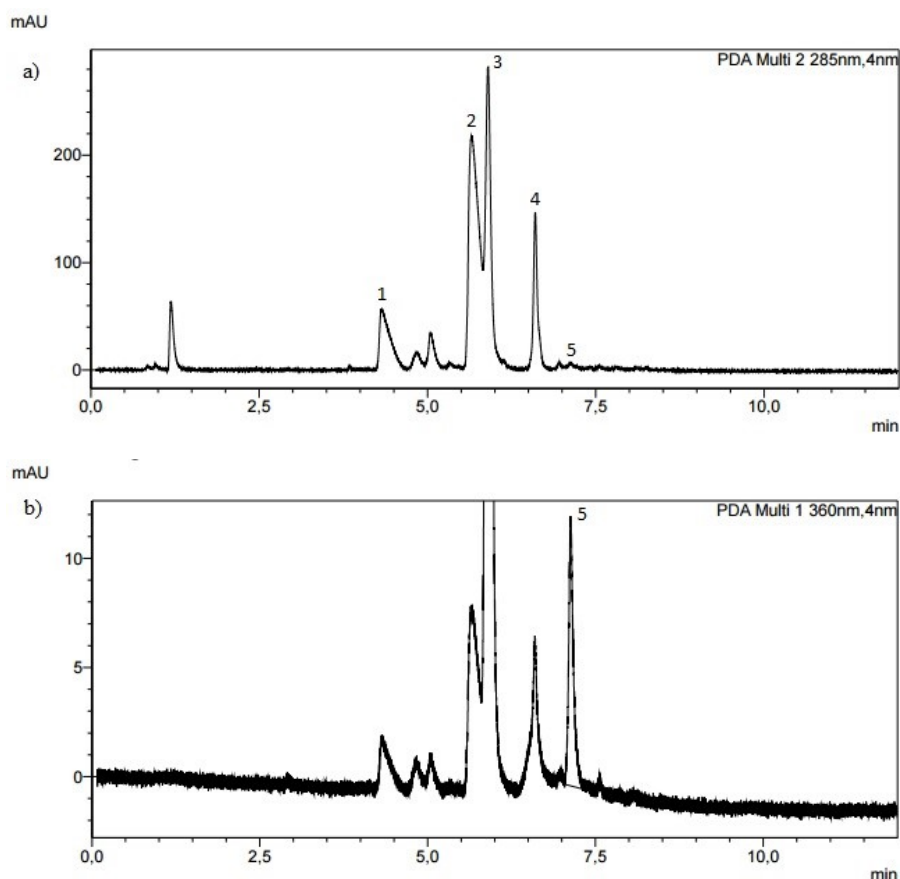
Obr. 4.4 HPLC chromatogramy průběhu sulfatace DHSB-A v čase:

a) 1h, b) 5h, c) 12h

1 – *p*-NPS, 2 – *p*-NP, 3 – DHSBS, 4 – DHSB

Při sulfataci silychristinu vznikal kromě sulfátu SCHS také sulfát jeho oxidované formy DHSCHS (obr. 4.5). Pro zjištění, zda k oxidaci dochází vlivem vzdušného kyslíku, byl testován vliv obsahu kyslíku v reakční směsi na poměr vznikajících produktů. Byly připraveny tři reakční směsi – probublání Ar (standardní postup,

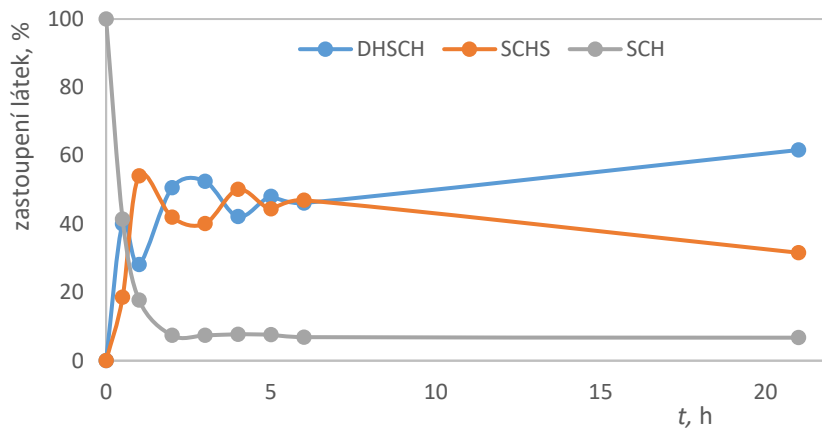
obr. 4.6), bez kyslíku (obr. 4.7) a se 100 % kyslíku (obr.4.8). Odběry byly prováděny v čase 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 a 21 h. Vzhledem k tomu, že oxidované deriváty flavonolignanů mají jiné absorpční maximum, než parentní látky (360 vs. 285 nm), byly připraveny kalibrační křivky, na základě kterých byly spočítány koncentrace jednotlivých látek v reakční směsi. Na základě tohoto experimentu bylo zjištěno, že přítomnost kyslíku na tvorbu DHSCH vliv nemá.



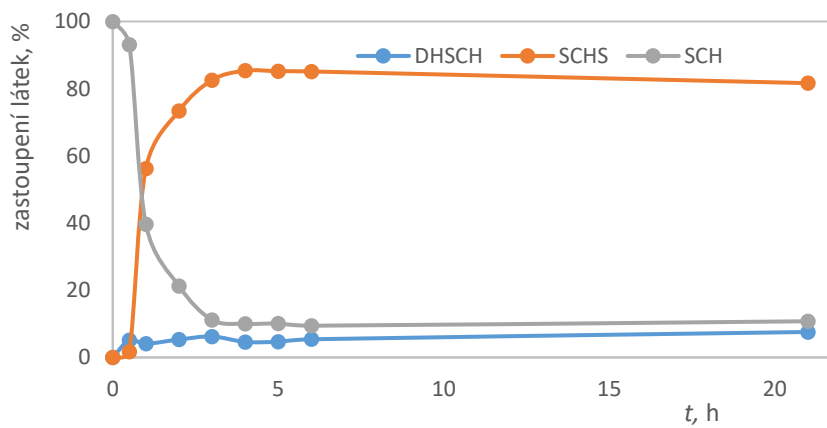
Obr. 4.5 HPLC chromatogramy průběhu sulfatace SCH v čase:

a) 1h při 285 nm, b) 1h při 360 nm

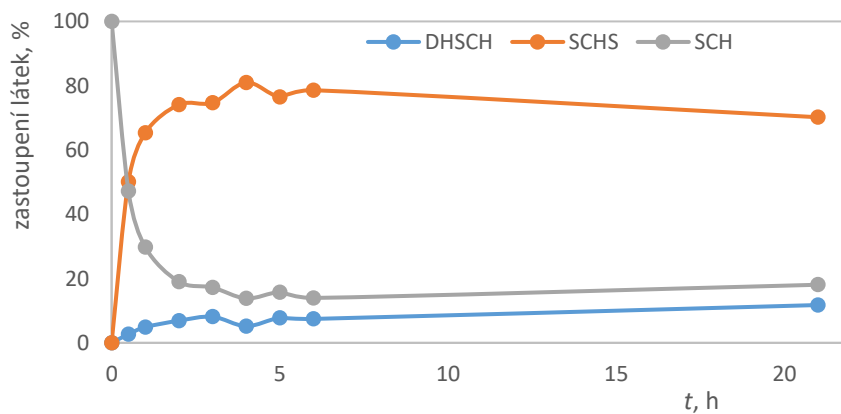
1 – *p*-NPS, 2 – SCHS, 3 – *p*-NP, 4 – SCH, 5 – DHSCHS



Obr. 4.6 Průběh sulfatace SCH (reakční směs probublaná argonem)



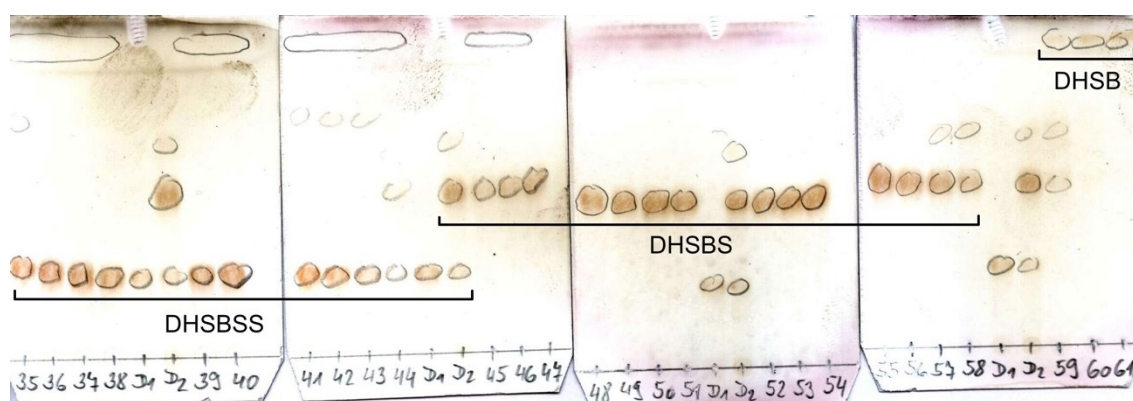
Obr. 4.7 Průběh sulfatace SCH (reakční směs bez kyslíku)



Obr. 4.8 Průběh sulfatace SCH (reakční směs se 100 % kyslíku)

### 4.1.3 Purifikace sulfatovaných produktů

V rámci této práce jsem se zabývala sulfatací 2,3-dehydrosilybinu a silychristinu pomocí arylsulfotransferasy z *Desulfitobacterium hafniense*. Práce zahrnovala vlastní přípravu sulfátů, jejíž součástí je časově poměrně náročná kultivace buněk *E. coli* transformovaných plazmidem pro tento enzym, indukci jeho exprese (IPTG), přípravu enzymu (lýza buněk ultrazvukem), přípravu reakční směsi (2,3-dehydrosilybin/silychristin v acetonu, *p*-nitrofenylsulfát a enzym ve 100 mM Tris-Gly pufru o pH 8,9) a její inkubace po dobu 4-6 hodin. Dále se zpracovávala reakční směs a separovaly vzniklé produkty. Reakční směs byla poměrně komplexní; obsahovala vždy velké množství *p*-nitrofenolu. Z 2,3-dehydrosilybinu vzniká směs mono- a disulfátů, nedocházelo však k úplné konverzi, proto byly přítomny i výchozí látky. Při sulfataci silychristinu docházelo k tvorbě převážně monosulfátů, jako vedlejší produkt jsme však izolovali vždy i sulfát 2,3-dehydrosilychristinu a velmi malé množství disulfátů obou látek. Reakční směs byla nejprve odpařena na asi poloviční objem, poté se upravilo pH na cca 7,6. Tato směs byla přečištěna vytřepáním do ethylacetátu (3×), vodná fáze po odpaření rozpuštěna v 80% methanolu, nerozpustné látky odděleny centrifugací a předčištěná směs rozdělena sloupcovou gelovou chromatografií (Sephadex LH-20). Účinnost extrakce a obsah látek ve frakcích po sloupcové chromatografii byla sledována pomocí chromatografie na tenké vrstvě (MF: ethylacetát/methanol/kyselina mravenčí – 4/1/0,01, viz obr. 4.9 a 4.10).

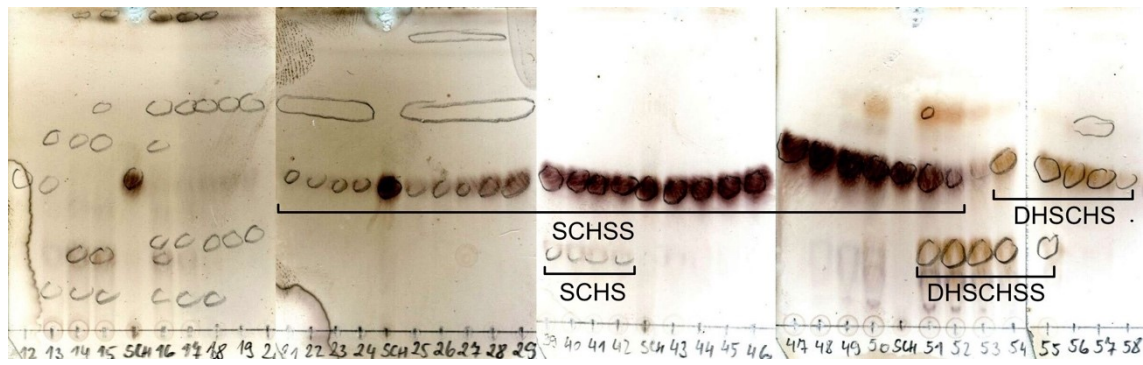


Obr. 4.9 TLC chromatogramy sulfatace DHSB

MF: ethylacetát/methanol/kyselina mravenčí, – 4/1/0,01 (v/v/v), DHSBSS

(2,3-dehydrosilybin disulfát), DHSBS (2,3-dehydrosilybin monosulfát), DHSB

(2,3-dehydrosilybin)



Obr. 4.10 TLC chromatogramy sulfátace SCH

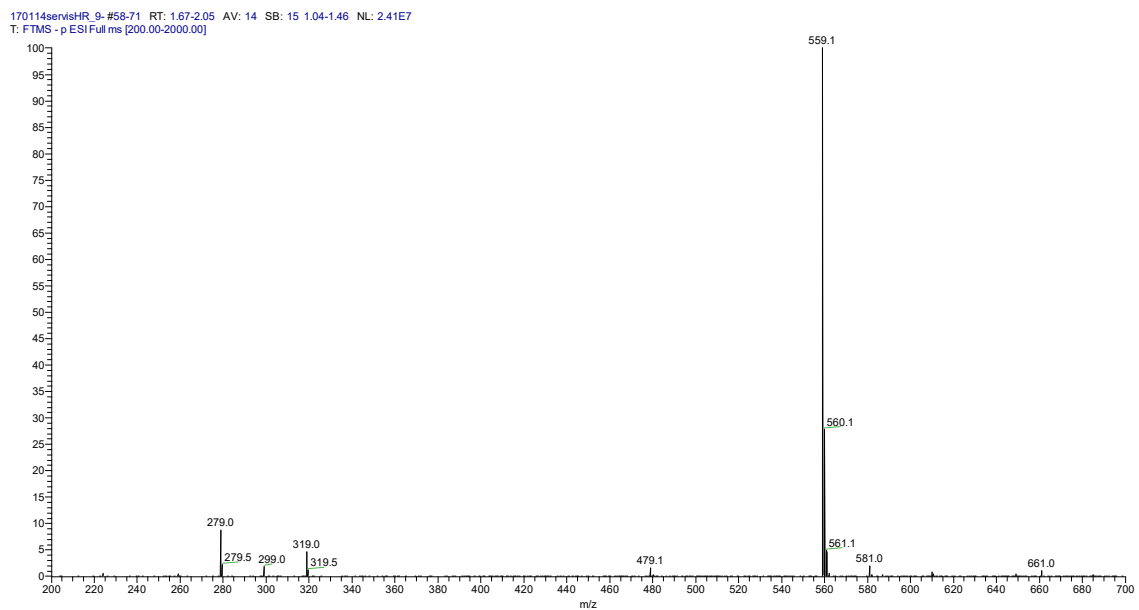
MF: ethylacetát/methanol/kyselina mravenčí, – 4/1/0,01 (v/v/v), SCHSS

(silychristin disulfát), SCHS (silychristin monosulfát), DHSCHSS

(2,3-dehydrosilychristin disulfát), DHSCHS (2,3-dehydrosilychristin monosulfát)

#### 4.1.4 Charakterizace sulfátů

Identita sulfátů analyzovaných látek byla potvrzena srovnáním jejich NMR dat (tab. 4.1, 4.2, 4.3 a 4.4) a MS spekter (obr. 4.11, 4.12, 4.13 a 4.14).

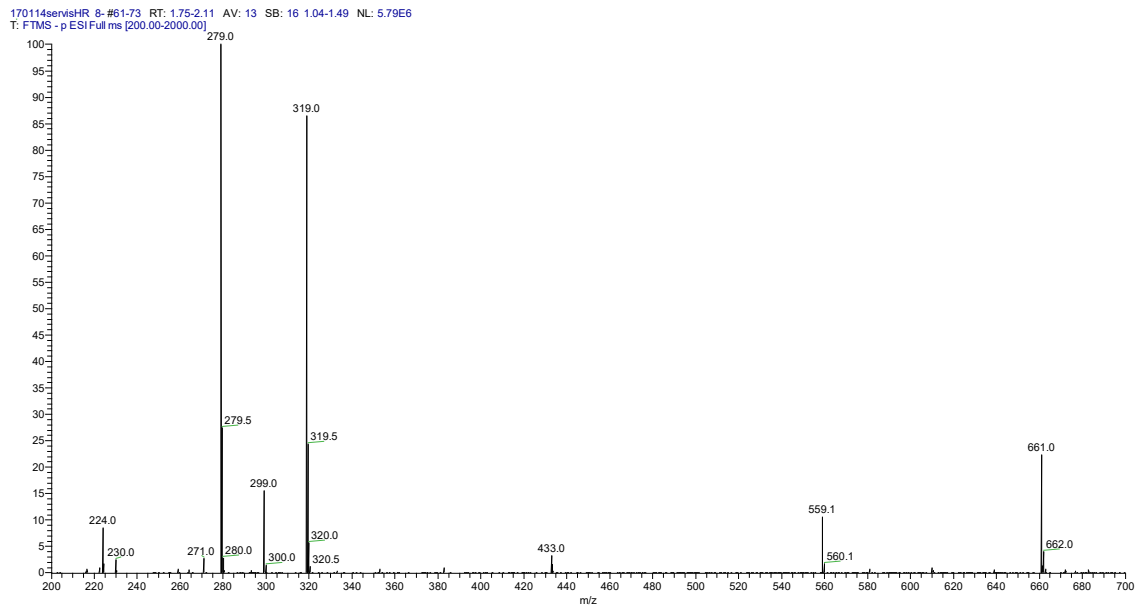


Obr. 4.11 ESI-MS spektrum 2,3-dehydrosilybin-20-*O*-sulfátu

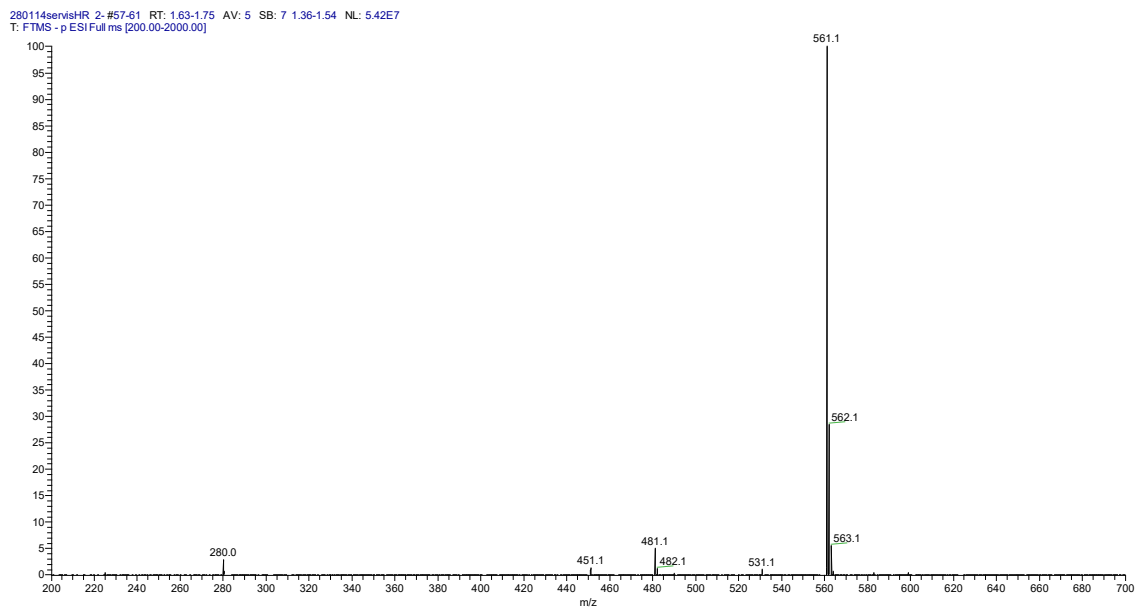
Tab. 4.1  $^{13}\text{C}$  a  $^1\text{H}$  NMR data pro 2,3-dehydrosilybin-20-*O*-sulfát

Atom	$\delta_{\text{C}}$ [ppm]	<i>m</i>	$\delta_{\text{H}}$ [ppm]	<i>n</i> (H)	<i>m</i>	<i>J</i> [Hz]
2	145,83	S	-	0		
3	136,45	S	-	0		
4	176,11	S	-	0		
4a	103,14	S	-	0		
5	160,74	S	-	0		
6	98,33	D	6,186	1	d	2
7	164,14	S	-	0		
8	93,64	D	6,461	1	d	2
8a	156,29	S	-	0		
10	78,52	D	4,303	1	ddd	7,9; 4,6; 2,5
11	75,81	D	5,018	1	d	7,9
12a	143,36	S	-	0		
13	116,22	D	7,78	1	m	
14	123,87	S	-	0		
15	121,42	D	7,77	1	m	
16	116,92	D	7,127	1	m	
16a	145,06	S	-	0		
17	131,24	S	-	0		
18	112,06	D	7,084	1	d	2
19	150,44	S	-	0		
20	143,28	S	-	0		
21	120,59	D	7,513	1	d	8,4
22	119,67	D	6,968	1	dd	8,4; 2,0
23	60,08	T	3,594	1	ddd	12,4; 4,8; 2,5
			3,391	1	ddd	12,4; 5,8; 4,6
3-OH	-	-	9,53	1	br s	
5-OH	-	-	12,406	1	s	
7-OH	-	-	10,803	1	br s	
19-OMe	55,82	Q	3,769	3	s	
23-OH	-	-	5,01	1	dd	5,8; 4,8

$\delta$  - chemický posun, *m* - multiplicita, *n* - počet vodíků, *J* - interakční konstanta



Obr. 4.12 ESI-MS spektrum 2,3-dehydrosilybin-7, 20-*O*-disulfátu



Obr. 4.13 ESI-MS spektrum silychristin-19-*O*-sulfátu



Tab. 4.2  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  NMR data pro 2,3-dehydrosilybin-7,20-*O*-disulfát

Atom	$\delta_{\text{C}}$ [ppm]	<i>m</i>	$\delta_{\text{H}}$ [ppm]	<i>n</i> (H)	<i>m</i>	<i>J</i> [Hz]
2	146,6	S	-	0		
3	136,78	S	-	0		
4	176,42	S	-	0		
4a	105,13	S	-	0		
5	159,80	S	-	0		
6	101,45	D	6,607	1	d	2
7	159,49	S	-	0		
8	97,70	D	6,958	1	d	2
8a	155,27	S	-	0		
10	78,56	D	4,298	1	ddd	7,9; 4,6; 2,5
11	75,79	D	5,026	1	d	7,9
12a	143,3	S	-	0		
13	116,68	D	7,869	1	m	
14	123,75	S	-	0		
15	121,25	D	7,757	1	m	
16	116,99	D	7,136	1	m	
16a	145,19	S	-	0		
17	131,22	S	-	0		
18	111,98	D	7,087	1	d	2
19	150,43	S	-	0		
20	143,24	S	-	0		
21	120,59	D	7,51	1	d	8,4
22	119,64	D	6,969	1	dd	8,4; 2,0
23	60,07	T	3,591	1	ddd	12,4; 5,0; 2,5
			3,385	1	ddd	12,4; 5,9; 4,6
3-OH	-	-	9,644	1	br s	
5-OH	-	-	12,325	1	s	
7-OH	-	-	-	1	br s	
19- OMe	55,8	Q	3,768	3	s	
23-OH	-	-	5,015	1	dd	5,9; 5,0

$\delta$  - chemický posun, *m* - multiplicita, *n* - počet vodíků, *J* - interakční konstanta

Tab. 4.3 <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H NMR data pro silychristin-19-*O*-sulfát

Atom	$\delta_C$ [ppm]	<i>m</i>	$\delta_H$ [ppm]	<i>n</i> (H)	<i>m</i>	<i>J</i> [Hz]
2	83,29	D	4,981	1	d	11,3
3	71,74	D	4,498	1	dd	11,3; 6,2
4	197,56	S	-	0		
4a	100,32	S	-	0		
5	163,36	S	-	0		
6	96,17	D	5,878	1	d	2
7	167,2 <sup>a</sup>	S	-	0		
8	95,17	D	5,844	1	d	2
8a	162,56	S	-	0		
10	86,85	D	5,509	1	d	7
11	53,6	D	3,489	1	ddd	7,0; 6,8; 5,5
11a	128,96	S	-	0		
12	115,36	D	6,871	1	d	1,7
13	130,19	S	-	0		
14	115,78	D	6,831	1	d	1,7
15	140,79	S	-	0		
15a	147,11	S	-	0		
16	136,66	S	-	0		
17	110,68	D	6,997	1	d	2
18	150,55	S	-	0		
19	142,53	S	-	0		
20	120,93	D	7,438	1	d	8,3
21	117,74	D	6,882	1	dd	8,3; 2,0
22	62,99	T	3,659	1	ddd	10,9; 6,8; 5,7
			3,747	1	ddd	10,9; 5,5; 5,2
3-OH	-	-	5,707	1	d	6,2
5-OH	-	-	11,916	1	s	
7-OH	-	-	10,747 <sup>b</sup>	1	br s	
15-OH	-	-	10,315 <sup>b</sup>	1	s	
18-OMe	55,83	Q	3,737	3	s	
22-OH	-	-	5,01	1	dd	5,7; 5,2

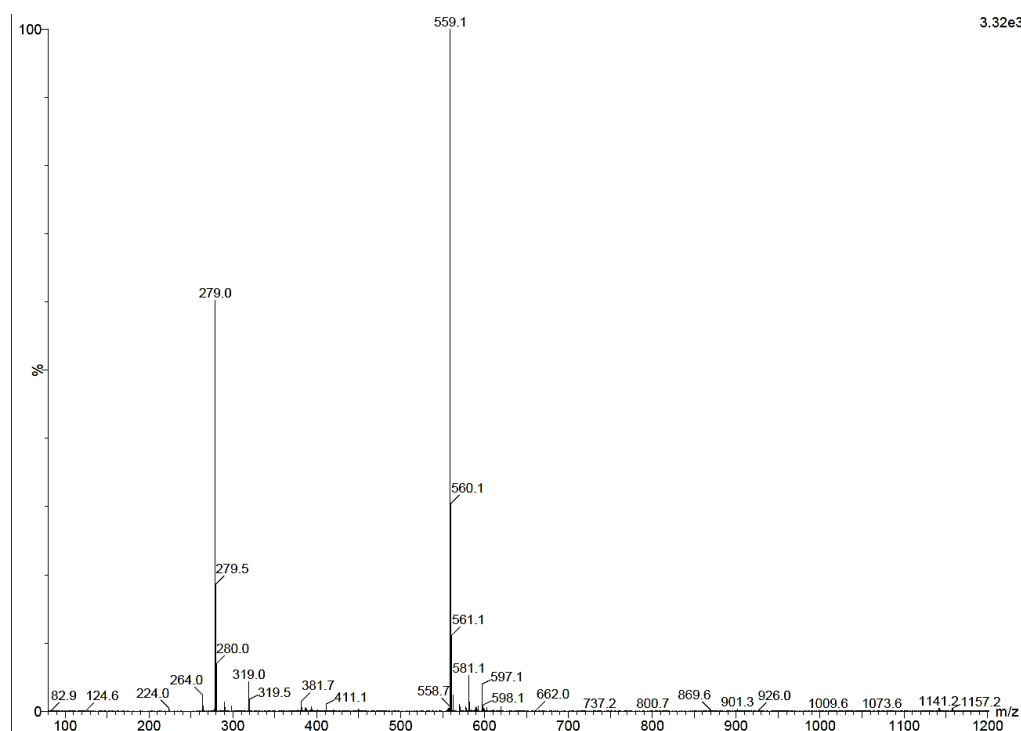
<sup>a</sup>přiřazeno metodou HSQC, <sup>b</sup>mohou být zaměněny

$\delta$  - chemický posun, *m* - multiplicita, *n* - počet vodíků, *J* - interakční konstanta

Tab. 4.4 <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H NMR data pro 2,3-dehydrosilychristin-19-*O*-sulfát

Atom	$\delta_C$ [ppm]	<i>m</i>	$\delta_H$ [ppm]	<i>n</i> (H)	<i>m</i>	<i>J</i> [Hz]
<b>2</b>	146,84	S		0		
<b>3</b>	135,84	S		0		
<b>4</b>	175,91	S		0		
<b>4a</b>	103,08	S		0		
<b>5</b>	160,77	S		0		
<b>6</b>	98,26	D	6,193	1	d	2
<b>7</b>	163,98	S		0		
<b>8</b>	93,44	D	6,42	1	d	2
<b>8a</b>	156,22	S		0		
<b>10</b>	87,3	D	5,602	1	d	6,6
<b>11</b>	53,27	D	3,578	1	m	
<b>11a</b>	129,74	S		0		
<b>12</b>	115,58	D	7,61	1	dd	1,8; 1,0
<b>13</b>	123,94	S		0		
<b>14</b>	116	D	7,647	1	dd	1,8; 0,4
<b>15</b>	140,98	S		0		
<b>15a</b>	148,76	S		0		
<b>16</b>	136,43	S		0		
<b>17</b>	110,72	D	7,007	1	d	2,1
<b>18</b>	150,61	S		0		
<b>19</b>	142,64	S		0		
<b>20</b>	121,01	D	7,457	1	d	8,3
<b>21</b>	117,78	D	6,894	1	ddd	8,3; 2,1; 0,4
<b>22</b>	63,01	T	3,774	1	m	
			3,722	1	m	
<b>3-OH</b>	-	-	9,347	1	s	
<b>5-OH</b>	-	-	12,457	1	s	
<b>7-OH</b>	-	-	10,757	1	s	
<b>15-OH</b>	-	-	9,599	1	s	
<b>O</b>	-	-				
<b>18-OMe</b>	55,87	Q	3,745	3	s	
<b>22-OH</b>	-	-	5,081	1	dd	$\Sigma J = 10.8$

$\delta$  - chemický posun, *m* - multiplicita, *n* - počet vodíků, *J* - interakční konstanta

Obr. 4.14 ESI-MS spektrum 2,3-dehydrosilychristin-19-*O*-sulfátu

#### 4.1.5 Zhášení 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylového radikálu

Výsledky z testu zhášení DPPH radikálu byly vyjádřeny jako hodnoty  $IC_{50}$ , které je nepřímě úměrné aktivitě testované látky (tab. 4.5). Nejlepší aktivitu vykazoval 2,3-dehydrosilychristin monosulfát s  $IC_{50} = 7,87 \mu M$ , DHSCH měl aktivitu jen nepatrně nižší. Schopnost zhášet DPPH u DHSB a jeho monosulfátu byla srovnatelná, zatímco u disulfátu nebylo hodnoty  $IC_{50}$  dosaženo ani při nejvyšší testované koncentraci ( $50 \mu M$ ).

Tab. 4.5 Hodnoty testu zhášení DPPH radikálu

vzorek	DPPH <sup>a</sup> ( $IC_{50}(\mu M)$ )
DHSB	$13,3 \pm 0,6$
DHSBS	$14,1 \pm 0,5$
DHSBSS	>50
SCH	$37,1 \pm 3,09$
SCHS	>50
DHSCH	$8,6 \pm 0,8$
DHSCHS	$7,9 \pm 0,3$

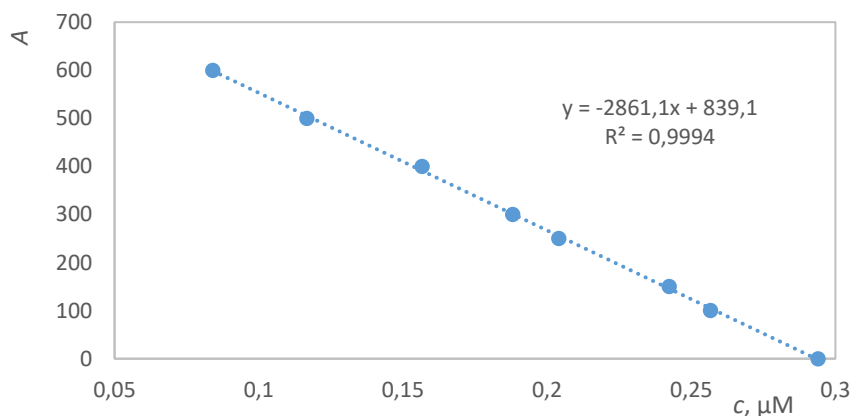
<sup>a</sup> 2,2-Difenyl-1-pikrylhydrazyl

#### 4.1.6 Zhášení radikálu 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové kyseliny)

V případě měření testu na zhášení ABTS<sup>•+</sup> radikálu byly výsledky uvedeny jako ekvivalenty vitamínu C (kalibrační křivka obr. 4.15, tab. 4.6). Nejvyšší aktivitu měl silychristin 1,50 CE.

Tab. 4.6 Hodnoty testu zhášení ABTS<sup>•+</sup> radikálu

vzorek	ABTS <sup>•+</sup> (CE)
DHSB	0,77 ± 0,01
DHSBS	0,71 ± 0,03
DHSBSS	0,55 ± 0,03
SCH	1,50 ± 0,09
SCHS	0,62 ± 0,03
DHSCH	0,93 ± 0,03
DHSCHS	0,62 ± 0,02



Obr. 4.15 Kalibrační křivka vitamínu C

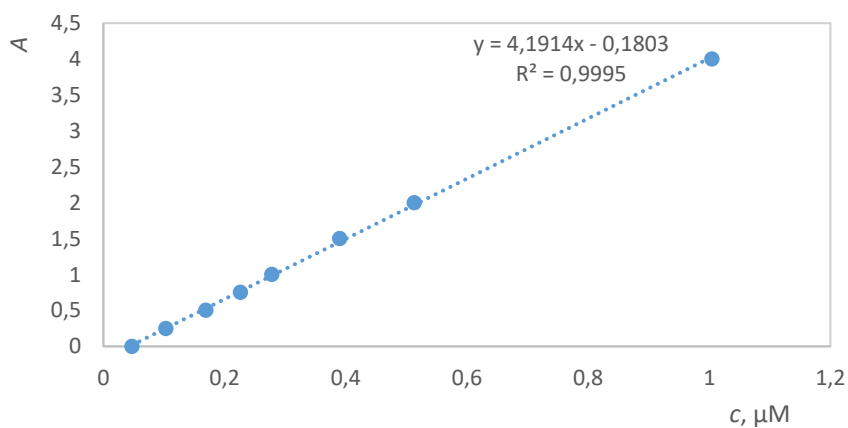
#### 4.1.7 Redukce Folin-Ciocalteuova činidla

Výsledky redukce Folin-Ciocalteuova činidla byly uvedeny jako ekvivalenty gallové kyseliny (kalibrační křivka obr. 4.16, tab. 4.7). Nejlepších výsledků bylo dosaženo u 2,3-dehydrosilychristinu s 1,58 GAE. Téměř stejné aktivity bylo dosaženo také u 2,3-dehydrosilybinu.

Tab. 4.7 Hodnoty testu redukce Folin-Ciocalteuova činidla

vzorek	FCR (GAE) <sup>b</sup>
DHSB	1,51 ± 0,09
DHSBS	1,03 ± 0,01
DHSBSS	0,95 ± 0,01
SCH	1,13 ± 0,23
SCHS	0,80 ± 0,11
DHSCH	1,58 ± 0,04
DHSCHS	1,44 ± 0,01

<sup>b</sup> redukce Folin-Ciocalteuova činidla (ekvivalenty gallové kyseliny měřeny při 1 mM)



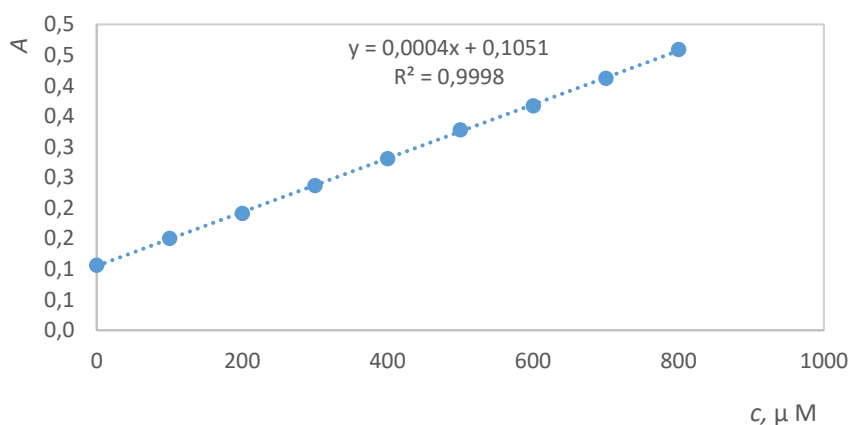
Obr. 4.16 Kalibrační křivka gallové kyseliny pro stanovení redukční kapacity

#### 4.1.8 Test schopnosti redukovat železité ionty

Výsledky testu FRAP byly uvedeny jako ekvivalenty  $\text{Fe}^{3+}$  (kalibrační křivka obr. 4.17, tab. 4.8). Nejvyšší antioxidační aktivitu měl 2,3-dehydrosilybin disulfát 1,61. Dále byly velmi aktivní oba monosulfáty 2,3-dehydrosilybinu a 2,3-dehydrosilychristinu.

Tab. 4.8 Hodnoty testu FRAP

vzorek	FRAP ( $\text{Fe}^{3+}$ )
DHSB	$0,81 \pm 0,02$
DHSBS	$1,46 \pm 0,03$
DHSBSS	$1,61 \pm 0,04$
SCH	$0,64 \pm 0,06$
SCHS	$0,05 \pm 0,00$
DHSCH	$0,28 \pm 0,01$
DHSCHS	$1,44 \pm 0,04$



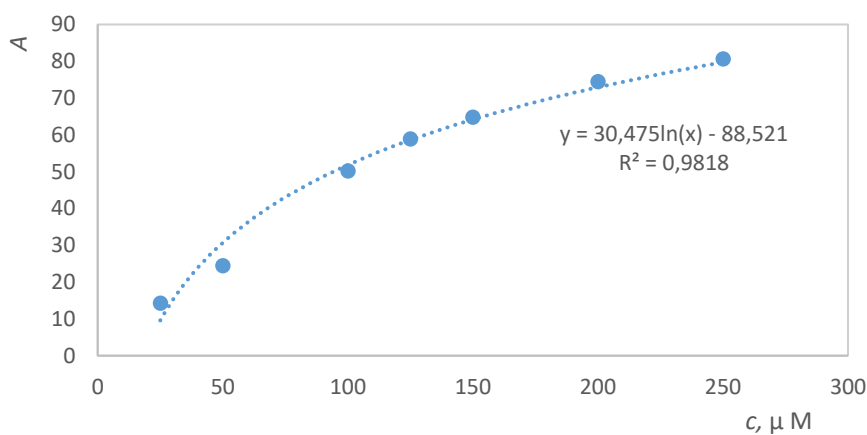
Obr. 4.17 Kalibrační křivka  $\text{Fe}^{3+}$

#### 4.1.9 Zhášení *N,N*-dimethyl-*p*-fenylendiaminového radikálu

Nejvyšší aktivitu v testu zhášení  $\text{DMPD}^{+\bullet}$  radikálu vykazoval 2,3-dehydrosilybin disulfát 1,90 CE. Výraznou aktivitu vykazoval rovněž silychristin a jeho monosulfát. Výsledky jsou uvedeny jako ekvivalenty vitamínu C (kalibrační křivka obr. 4.18, tab. 4.9). Kalibrační křivka v tomto testu není lineární, pravděpodobně jsme se dostali mimo oblast platnosti Lambert-Beerova zákona.

Tab. 4.9 Hodnoty testu  $\text{DMPD}^{+\bullet}$

vzorek	$\text{DMPD}^{+\bullet}$ (CE)
DHSB	$1,02 \pm 0,02$
DHSBS	$0,97 \pm 0,02$
DHSBSS	$1,90 \pm 0,10$
SCH	$1,50 \pm 0,02$
SCHS	$1,56 \pm 0,08$
DHSCH	$0,97 \pm 0,02$
DHSCHS	$1,02 \pm 0,04$



Obr. 4.18 Kalibrační křivka vitamínu C



#### 4.1.10 Inhibice peroxidace lipidů

Výsledky inhibice lipoperoxidace lipidů byly vyjádřeny v hodnotách  $IC_{50}$  (viz tab. 4.10). Nejvyšší aktivitu vykazoval 2,3-dehydrosilybin s  $IC_{50} = 10,4 \mu\text{M}$ . Stejně jako v případě testu na zhášení DPPH nebylo v testu inhibice peroxidace lipidů dosaženo hodnoty  $IC_{50}$  ani u 2,3-dehydrosilybin disulfátu ani u silychristinu.

Tab. 4.10 Hodnoty testu inhibice peroxidace lipidů

vzorek	Lpx <sup>c</sup> ( $IC_{50}(\mu\text{M})$ )
DHSB	$10,4 \pm 0,4$
DHSBS	$13,7 \pm 0,4$
DHSBSS	>50
SCH	$17,9 \pm 0,7$
SCHS	>50
DHSCH	$14,6 \pm 0,4$
DHSCHS	$12,0 \pm 1,8$

<sup>c</sup> inhibice lipoperoxidace krysích jaterních mikrosomů indukované *t*-butylhydroperoxidem

#### 4.1.11 Zhodnocení biologické aktivity

Nejlepší antioxidační aktivitu v testu pro zhášení DPPH radikálu měl 2,3-dehydrosilychristin monosulfát ( $IC_{50} = 7,9 \mu\text{M}$ ), v případě redukce Folin-Ciocalteuova činidla 2,3-dehydrosilychristin (1,58 GAE), při měření testu zhášení  $ABTS^{+\bullet}$  radikálu silychristin (1,50 CE), u testu inhibice peroxidace lipidů to byl 2,3-dehydrosilybin ( $IC_{50} = 10,4 \mu\text{M}$ ), v testu FRAP měl nejvyšší aktivitu 2,3-dehydrosilybin disulfát (1,61 ekvivalentů  $Fe^{3+}$ ), a u testu na zhášení  $DMPD^{+\bullet}$  měl nejvyšší aktivitu také 2,3-dehydrosilybin disulfát (1,90 CE).

Jak je již na první pohled patrné, hodnoty se u jednotlivých testů lišily. To může být způsobené rozdílným mechanismem antioxidačních testů. Například u testu zhášení  $ABTS^{+\bullet}$  probíhá jen přesun elektronů, zatímco u testu na zhášení DPPH radikálu může dojít i k přesunu H atomu z antioxidantu. Z tohoto důvodu je možné předpokládat rozdílné výsledky [10].

V tab. 4.11 je uvedeno zhodnocení výsledků testů podle antioxidační aktivity vzorků

(sestupně). Z výsledků se obecně nedá usoudit, jestli jsou zkoumané látky lepším antioxidantem v sulfatované nebo nesulfatované formě.

V případě měření testu FRAP je vidět, že neaktivnější jsou sulfatované dehydroderiváty. V případě měření zhášení DPPH radikálu a inhibice peroxidace lipidů u silychristinu sulfátu a 2,3-dehydrosilybinu disulfátu nebyla hodnota  $IC_{50}$  dosažena ani v nejvyšší použité koncentraci, takže jejich aktivita v těchto testech byla velice nízká.

Tab. 4.11 – Zhodnocení výsledků podle antioxidační aktivity vzorků

metoda	vzorek	hodnota	metoda	vzorek	hodnota
DPPH ( $IC_{50}$ )	DHSCHS	7,87	Lpx ( $IC_{50}$ )	DHSB	10,66
	DHSCH	8,63		DHSCHS	11,97
	DHSBS	14,5		DHSBS	13,66
	DHSB	15,3		DHSCH	14,59
	SCH	37,06		SCH	17,93
	SCHS	> 50		SCHS	> 50
	DHSBSS	> 50		DHSBSS	> 50
FCR (GAE)*	DHSCH	1,58	ABTS <sup>+</sup> (CE)**	SCH	1,5
	DHSB	1,51		DHSCH	0,93
	DHSCHS	1,44		DHSB	0,77
	SCH	1,13		DHSBS	0,71
	DHSBS	1,03		DHSCHS	0,62
	DHSBSS	0,95		SCHS	0,62
	SCHS	0,8		DHSBSS	0,55
FRAP ( $Fe^{3+}$ )***	DHSBSS	1,61	DMPD <sup>+</sup> (CE)**	DHSBSS	1,9
	DHSBS	1,46		SCHS	1,56
	DHSCHS	1,44		SCH	1,5
	DHSB	0,81		DHSB	1,02
	SCH	0,64		DHSCHS	1,02
	DHSCH	0,28		DHSBS	0,97
	SCHS	0,05		DHSCH	0,97

\*ekvivalenty gallové kyseliny

\*\*ekvivalenty vitamínu C

\*\*\*ekvivalenty  $Fe^{3+}$

Bakteriální AST z *D. hafniense* se ukázala jako ideální nástroj pro biotransformaci celé škály flavonoidů. Navíc je stabilní, vysoce účinná a dává velké výtěžky (50-80 %).

---

Sulfatované produkty jsou identické při použití obou AST [43]. Tato bakteriální AST byla použita i k sulfataci steroidů [45].

V rámci této diplomové práce jsou výsledky antioxidační aktivity sulfatovaných minoritních flavonolignanů uvedeny vůbec poprvé. V literatuře jsme nenalezli článek, který by se tímto tématem zabýval, nicméně biologická aktivita nesulfatovaných minoritních flavonolignanů publikována byla. Tomuto tématu se věnuje práce [30], v níž byla stanovena redukční kapacita Folin-Ciocalteuovým činidlem, schopnost zhasět DPPH a ABTS<sup>+</sup> radikál a inhibice peroxidace lipidů. Studie zahrnuje pouze data pro DHSB, SCH a DHSCH. Pro DHSB jsou obdobné výsledky v testu FCR, LPX i zhasení DPPH, ale liší se u testu pro zhasení ABTS<sup>+</sup>. U SCH byly výsledky všech testů v dobré shodě, kromě testu na zhasení DPPH radikálu. Pro DHSCH se výsledky lišily u všech testů. V článku [28] byla zkoumána pouze inhibice peroxidace lipidů a schopnost zhasět DPPH radikál pro DHSB. U testu LPX byla data ve shodě s našimi výsledky, ale v testu zhasení DPPH nikoli. V článku [10] se zabývají také testováním biologické aktivity DHSB, SCH a DHSCH. U prvních dvou látek jsou data v dobré shodě s našimi daty, ovšem v případě DHSCH se liší. V testu DPPH se jeví DHSCH podle zmiňovaného článku aktivnější než v našem případě.

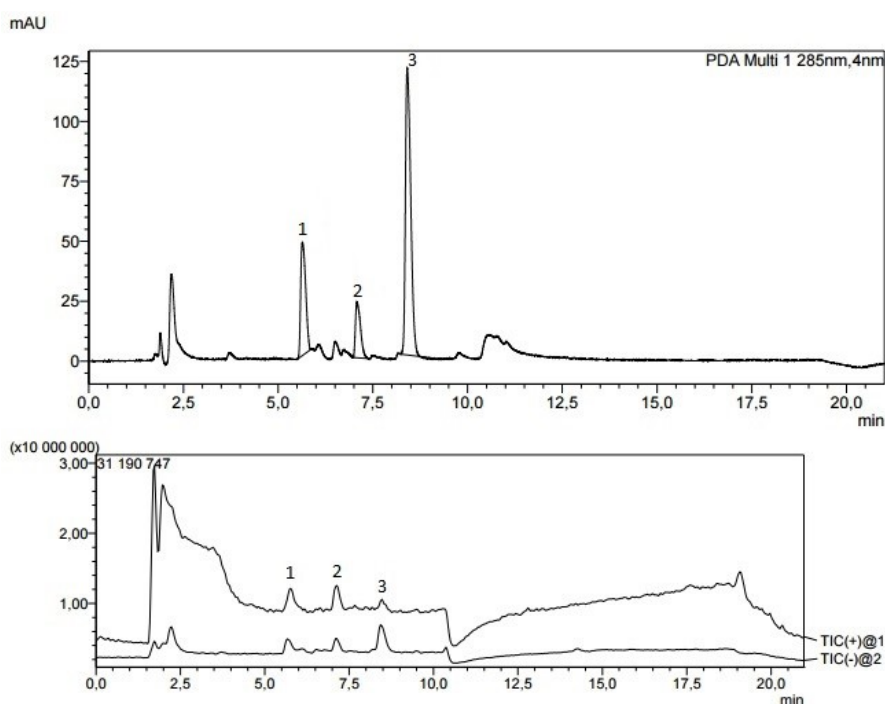
V případě sulfatace silybinu jsou výtěžky sulfatovaných produktů poměrně vysoké (kolem 60 %), přičemž rychleji se sulfatuje silybin B [50]. V případě sulfatace 2,3-dehydrosilybinu se také rychleji sulfatuje stereoisomer B, ovšem výtěžnost je jen okolo 10 % (monosulfát) a 12 % (disulfát). Při sulfataci silychristinu je výtěžnost asi 40 %. Obecně je u flavonoidů výtěžnost poměrně nízká, což je dané obsahem velkého množství hydroxylových skupin, které mají tendenci se spojovat a nelze je tudíž oddělit.

## 4.2 Glukuronidy

Vzorky ze studie časového průběhu tvorby glukuronidů SCH byly analyzovány nejen pomocí HPLC, ale také pomocí MS. Na obr. 4.19 je porovnání HPLC a MS spektra této glukuronidace. Vypočtená hmotnost pro glukuronid SCH byla 658. Na obr. 4.20 a obr. 4.20 b jsou vidět píky s hmotou 657 (měřeno v záporném módu), což dokazuje skutečnou přítomnost glukuronidů. Podařilo se tedy potvrdit tvorbu dvou glukuronidů. Na obr. 4.20 c je zobrazeno MS spektrum SCH v záporném módu.

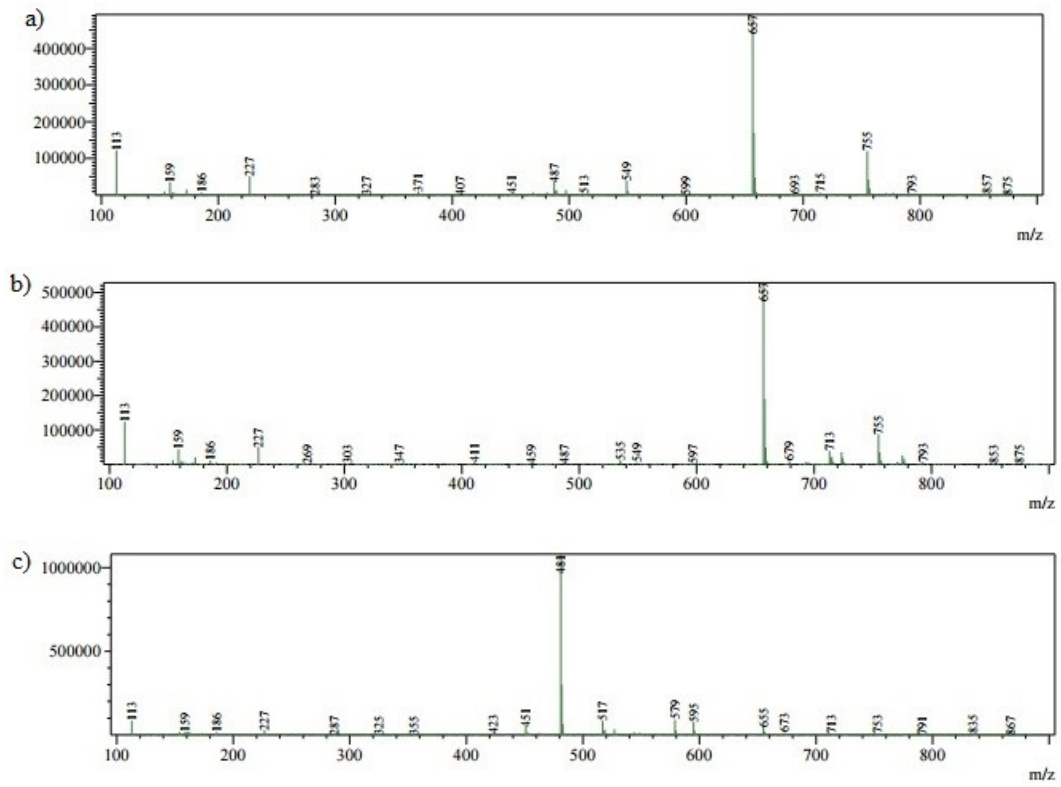
Při studiu optimalizace podmínek této reakce bylo zjištěno, že koncentrace UDP-glukuronové kyseliny nemá významný vliv na tvorbu glukuronidů silychristinu, naopak koncentrace přidaných mikrozomů vliv na jejich tvorbu má.

Tato studie se nachází v prvotní fázi, další výzkum bude i nadále probíhat v Laboratoři biotransformací na MBÚ, AV ČR.



Obr. 4.19 HPLC a MS spektrum glukuronidace SCH:

1 – glukuronid č.1, 2 – glukuronid č.2, 3 – SCH



Obr. 4.20 MS spektrum produktů glukuronidace SCH v záporném módu:

a) glukuronid č.1, b) glukuronid č.2, c) SCH

---

## 5 Závěr

V rámci této diplomové práce jsme připravili standardy metabolitů druhé fáze biotransformace vybraných minoritních flavonolignanů (2,3-dehydrosilybin-20-*O*-sulfát, 2,3-dehydrosilybin-7,20-*O*-disulfát, silychristin-19-*O*-sulfát, 2,3-dehydrosilychristin-19-*O*-sulfát), purifikovali je a optimalizovali jejich přípravu.

U všech produktů byla studována biologická aktivita a biofyzikální parametry. V testu zhášení DPPH byl nejúčinnějším antioxidantem 2,3-dehydrosilychristin sulfát ( $IC_{50} = 7,87 \pm 0,26 \mu\text{M}$ ), při zhášení ABTS<sup>•+</sup> radikálu silychristin ( $1,50 \pm 0,09 \text{ CE}$ ), redukcí Folin-Ciocalteuova činidla 2,3-dehydrosilychristin ( $1,58 \pm 0,26 \text{ GAE}$ ), v případě inhibice peroxidace lipidů 2,3-dehydrosilybin ( $IC_{50} = 10,44 \pm 0,37 \mu\text{M}$ ), u testu FRAP 2,3-dehydrosilybin disulfát ( $1,61 \pm 0,04 \text{ Fe}^{3+}$ ) stejně jako u testu zhášení DMPD<sup>•+</sup> radikálu ( $1,90 \pm 0,10 \text{ CE}$ ).

Součástí této diplomové práce byla také příprava glukuronidů silychristinu. Na základě této studie byla potvrzena jejich tvorba a dále bylo zjištěno, že změna koncentrace UDP-glukuronové kyseliny nemá významný vliv na tvorbu produktů, zatímco koncentrace použitých mikrosomů ano.

## 6 Literatura

- [1] Reina, M.; Martinez, A.: Silybin and 2,3-Dehydrosilybin Flavonolignans as Free Radical Scavengers. *Journal of Physical Chemistry B*, **119**:35, 11597-11606 (2015).
- [2] Javed, S.; Kohli, K.; Ali, M.: Reassessing Bioavailability of Silymarin. *Alternative Medicine Review*, **16**:3, 239-249 (2011).
- [3] Abenavoli, L.; Capasso, R.; Milic, N.; Capasso, F.: Milk thistle in liver diseases: past, present, future. *Phytotherapy Research*, **24**:10, 1423-1432 (2010).
- [4] Agarwal, C.; Wadhwa, R.; Deep, G.; Biedermann, D.; Gažák, R.; Křen, V.; Agarwal, R.: Anti-cancer efficacy of silybin derivatives -- a structure-activity relationship. *PLoS One*, **8**:3, e60074 (2013).
- [5] Abourashed, E. A.; Mikell, J. R.; Khan, I. A.: Bioconversion of silybin to phase I and II microbial metabolites with retained antioxidant activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **20**:9, 2784-2788 (2012).
- [6] Crozier, A.; Del Rio, D.; Clifford, M. N.: Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine*, **31**:6, 446-467 (2010).
- [7] Bravo, L.: Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, **56**:11, 317-333 (1998).
- [8] Quideau, S.; Deffieux, D.; Douat-Casassus, C.; Pouységú, L.: Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, **50**:586-621 (2011).
- [9] Kerimi, A.; Williamson, G.: At the interface of antioxidant signalling and cellular function: Key polyphenol effects. *Molecular Nutrition & Food Research*, **60**:8, 1770-1788 (2016).
- [10] Pyszková, M.; Biler, M.; Biedermann, D.; Valentová, K.; Kuzma, M.; Vrba, J.; Ulrichová, J.; Sokolová, R.; Mojović, M.; Popović-Bijelić, A.; Kubala, M.; Trouillas, P.; Křen, V.; Vacek, J.: Flavonolignan 2,3-dehydroderivatives: Preparation, antiradical and cytoprotective activity. *Free Radical Biology and Medicine*, **90**:114-125 (2016).
- [11] Tsao, R.: Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*, **2**:12, 1231-1246 (2010).
- [12] Han, X. Z.; Shen, T.; Lou, H. X.: Dietary polyphenols and their biological significance. *International Journal of Molecular Sciences*, **8**:9, 950-988 (2007).
- [13] Harmatha, J.: *Chemie a biochemie přírodních látek* Praha, ÚOCHB 2002.
- [14] Aherne, S. A.; O'Brien, N. M.: Dietary flavonols: Chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*, **18**:1, 75-81 (2002).
- [15] Birt, D. F.; Hendrich, S.; Wang, W.: Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, **90**:2-3, 157-177 (2001).
- [16] Biedermann, D.; Vavříková, E.; Cvak, L.; Křen, V.: Chemistry of silybin. *Natural Products Reports*, **31**:9, 1138-1157 (2014).
- [17] Gažák, R.; Marhol, P.; Purchartová, K.; Monti, D.; Biedermann, D.; Riva, S.; Cvak, L.; Křen, V.: Large-scale separation of silybin diastereoisomers using lipases. *Process Biochemistry*, **45**:10, 1657-1663 (2010).

- [18] Gavezzotti, P.; Vavříková, E.; Valentová, K.; Fronza, G.; Kudanga, T.; Kuzma, M.; Riva, S.; Biedermann, D.; Křen, V.: Enzymatic oxidative dimerization of silymarin flavonolignans. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, **109**:24-30 (2014).
- [19] Psotová, J.; Chlopčíková, S.; Grambal, F.; Šimánek, V.; Ulrichová, J.: Influence of silymarin and its flavonolignans on doxorubicin-iron induced lipid peroxidation in rat heart microsomes and mitochondria in comparison with quercetin. *Phytotherapy Research*, **16**:S63-S67 (2002).
- [20] Gažák, R.; Walterová, D.; Křen, V.: Silybin and silymarin-new and emerging applications in medicine. *Curr. Med. Chem.*, **14**:3, 315-338 (2007).
- [21] Křen, V.; Ulrichová, J.; Kosina, P.; Stevenson, D.; Sedmera, P.; Příkrylová, V.; Halada, P.; Šimánek, V.: Chemoenzymatic preparation of silybin beta-glucuronides and their biological evaluation. *Drug Metabolism and Disposition*, **28**:12, 1513-1517 (2000).
- [22] Vavříková, E.; Vacek, J.; Valentová, K.; Marhol, P.; Ulrichová, J.; Kuzma, M.; Křen, V.: Chemo-Enzymatic Synthesis of Silybin and 2,3-Dehydrosilybin Dimers. *Molecules*, **19**:4, 4115-4134 (2014).
- [23] Gažák, R.; Sedmera, P.; Vrbacký, M.; Vostálová, J.; Drahotka, Z.; Marhol, P.; Walterová, D.; Křen, V.: Molecular mechanisms of silybin and 2,3-dehydrosilybin antiradical activity-role of individual hydroxyl groups. *Free Radical Biology and Medicine*, **46**:6, 745-758 (2009).
- [24] Gažák, R.; Trouillas, P.; Biedermann, D.; Fuksová, K.; Marhol, P.; Kuzma, M.; Křen, V.: Base-catalyzed oxidation of silybin and isosilybin into 2,3-dehydro derivatives. *Tetrahedron Letters*, **54**:4, 315-317 (2013).
- [25] Gažák R., S. P., Křen V.: Antiradikálová aktivita flavonolignanů silybinu a 2,3-dehydrosilybinu - studium mechanismu a syntéza nových derivátů *Chemické listy*, **102**:634 (2008).
- [26] Gažák, R.; Valentová, K.; Fuksová, K.; Marhol, P.; Kuzma, M.; Medina, M. A.; Oborná, I.; Ulrichová, J.; Křen, V.: Synthesis and Antiangiogenic Activity of New Silybin Galloyl Esters. *Journal of Medicinal Chemistry*, **54**:20, 7397-7407 (2011).
- [27] Karas, D.; Gažák, R.; Valentová, K.; Chambers, C. S.; Pivodová, V.; Biedermann, D.; Křenková, A.; Oborná, I.; Kuzma, M.; Cvačka, J.; Ulrichová, J.; Křen, V.: Effects of 2,3-Dehydrosilybin and Its Galloyl Ester and Methyl Ether Derivatives on Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Journal of Natural Products*, **79**:4, 812-820 (2016).
- [28] Trouillas, P.; Marsal, P.; Svobodová, A.; Vostálová, J.; Gažák, R.; Hrbáč, J.; Sedmera, P.; Křen, V.; Lazzaroni, R.; Duroux, J. L.; Walterová, D.: Mechanism of the antioxidant action of silybin and 2,3-dehydrosilybin flavonolignans: a joint experimental and theoretical study. *The Journal of Physical Chemistry A*, **112**:5, 1054-1063 (2008).
- [29] Tanaka, H.; Hiroo, M.; Ichino, K.; Ito, K.: Total Synthesis of Silychristin, an Antihepatotoxic Flavonolignan. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*:11, 749-751 (1988).
- [30] Biedermann, D.; Buchta, M.; Holečková, V.; Sedlák, D.; Valentová, K.; Cvačka, J.; Bednářová, L.; Křenková, A.; Kuzma, M.; Škuta, C.; Peikerová, Ž.; Bartůněk, P.; Křen, V.: Silychristin: Skeletal Alterations and Biological Activities. *Journal of Natural*



---

*Products*, **79**:12, 3086-3092 (2016).

- [31] Zielinska-Przyjemska, M.; Wiktorowicz, K.: An in vitro study of the protective effect of the flavonoid silydianin against reactive oxygen species. *Phytotherapy Research*, **20**:2, 115-119 (2006).
- [32] Ignatowicz, E.; Szaefer, H.; Zielinska, M.; Korczowska, I.; Fenrych, W.: Silybin and silydianin diminish the oxidative metabolism of human polymorphonuclear neutrophils. *Acta Biochimica Polonica*, **44**:1, 127-129 (1997).
- [33] Stiborová M., H. J., Hodek P., Frei E.: Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chemické listy*, **93**:229-237 (1999).
- [34] Levsen, K.; Schiebel, H. M.; Behnke, B.; Dotzer, R.; Dreher, W.; Elend, M.; Thiele, H.: Structure elucidation of phase II metabolites by tandem mass spectrometry: an overview. *Journal of Chromatography A*, **1067**:1-2, 55-72 (2005).
- [35] Stevenson, D. E.; Hubl, U.: Optimization of beta-D-glucuronide synthesis using UDP-glucuronyl transferase. *Enzyme and Microbial Technology*, **24**:7, 388-396 (1999).
- [36] Jančová, P.; Anzenbacherová, E.; Papoušková, B.; Lemr, K.; Lužná, P.; Veinlichová, A.; Anzenbacher, P.; Šimánek, V.: Silybin is metabolized by cytochrome P450 2C8 in vitro. *Drug Metabolism and Disposition*, **35**:11, 2035-2039 (2007).
- [37] Křen, V.; Marhol, P.; Purchartová, K.; Gabrielová, E.; Modrianský, M.: Biotransformation of Silybin and its Congeners. *Current Drug Metabolism*, **14**:10, 1009-1021 (2013).
- [38] Dostálek, M.: *Farmakokinetika*. Praha, Grada Publishing a.s. 2006.
- [39] Lata, J.; Vaňásek, T.: *Kritické stavy v hepatologii*. Praha, Grada Publishing a.s. 2005.
- [40] Jančová, P.; Anzenbacher, P.; Anzenbacherová, E.: Phase II Drug Metabolizing Enzymes. *Biomedical Papers*, **154**:2, 103-116 (2010).
- [41] Hayes, A. W.; Kruger, C. L.: *Principles and Methods of Toxicology*. 5th ed. Boca Raton, CRC Press 2007.
- [42] Marhol, P.; Hartog, A. F.; van der Horst, M. A.; Wever, R.; Purchartová, K.; Fuksová, K.; Kuzma, M.; Cvačka, J.; Křen, V.: Preparation of silybin and isosilybin sulfates by sulfotransferase from *Desulfitobacterium hafniense*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **89**:24-27 (2013).
- [43] Purchartová, K.; Valentová, K.; Pelantová, H.; Marhol, P.; Cvačka, J.; Havlíček, L.; Křenková, A.; Vavříková, E.; Biedermann, D.; Chambers, C. S.; Křen, V.: Prokaryotic and Eukaryotic Aryl Sulfotransferases: Sulfation of Quercetin and Its Derivatives. *Chemcatchem*, **7**:19, 3152-3162 (2015).
- [44] Ayuso-Fernandéz, I.; Galmés, M. A.; Bastida, A.; García-Junceda, E.: Aryl Sulfotransferase from *Haliangium ochraceum*: A Versatile Tool for the Sulfation of Small Molecules. *Chemcatchem*, **6**:4, 1059-1065 (2014).
- [45] van der Horst, M. A.; van Lieshout, J. F. T.; Bury, A.; Hartog, A. F.; Wever, R.: Sulfation of Various Alcoholic Groups by an Arylsulfate Sulfotransferase from *Desulfitobacterium hafniense* and Synthesis of Estradiol Sulfate. *Advanced Synthesis & Catalysis*, **354**:18, 3501-3508 (2012).
- [46] Fournelgigleux, S.; Jackson, M. R.; Wooster, R.; Burchell, B.: Expression of a

---

Human-Liver Cdna-Encoding a Udp-Glucuronosyltransferase Catalyzing the Glucuronidation of Hyodeoxycholic Acid in Cell-Culture. *Febs Letters*, **243**:2, 119-122 (1989).

[47] Scalbert, A.; Williamson, G.: Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition*, **130**:8, 2073s-2085s (2000).

[48] Džubák, P.; Hajduch, M.; Gažák, R.; Svobodová, A.; Psotová, J.; Walterová, D.; Sedmera, P.; Křen, V.: New derivatives of silybin and 2,3-dehydrosilybin and their cytotoxic and P-glycoprotein modulatory activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **14**:11, 3793-3810 (2006).

[49] Křenek, K.; Marhol, P.; Peikerová, Ž.; Křen, V.; Biedermann, D.: Preparatory separation of the silymarin flavonolignans by Sephadex LH-20 gel. *Food Research International*, **65**:0, 115-120 (2014).

[50] Purchartová, K.; Engels, L.; Marhol, P.; Šulc, M.; Kuzma, M.; Slámová, K.; Elling, L.; Křen, V.: Enzymatic preparation of silybin phase II metabolites: sulfation using aryl sulfotransferase from rat liver. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **97**:24, 10391-10398 (2013).