

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BIOCHEMIE



Antioxidační aktivita nových derivátů silybinu

Bakalářská práce

Kateřina Purchartová

Školitelka: Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Prof. Ing. Vladimír Křen, DrSc.

Praha 2008

UNIVERZITA KARLOVA v Praze
Přirodovědecká fakulta
Oborová knihovna chemie
Albertov 6, 128 43 Praha 2
IČO: 00216208, DIČ: CZ00216208
UK 22

*pr.č. 132 b/08 stud
(biochemie)*

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením Prof. RNDr. Marie Stiborové, DrSc. a Prof. Ing. Vladimíra Křena, DrSc. a všechny prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne 4.6.2008

Kateřina Purchartová

Kateřina Purchartová

Ráda bych poděkovala své školitelce Prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za zadání tématu a cenné rady při vypracování této práce.

Dále děkuji Prof. Ing. Vladimíru Křenovi, DrSc. za odborné vedení, četné rady a připomínky, Ing. Radkovi Gažákovi, PhD. za všestrannou pomoc a obětavou spolupráci při řešení této bakalářské práce.

OBSAH

| | |
|---|-----------|
| SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK | 6 |
| 1 ÚVOD | 7 |
| 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY | 8 |
| 2.1 Ostropestřec mariánský (<i>Silybum marianum</i>) | 8 |
| 2.2 Složení silymarinu | 8 |
| 2.3 Diastereoizomery silybinu a jejich dělení | 10 |
| 2.4 Biosyntéza silybinu a jeho chemická syntéza | 11 |
| 2.5 Semisyntetické deriváty silybinu | 15 |
| 2.6 Biologické účinky silybinu (silymarinu) | 15 |
| 2.6.1 Antihepatotoxická aktivita silybinu vůči působení xenobiotik | 16 |
| 2.6.2 Antioxidační účinky flavonoidů | 19 |
| 2.6.3 Antioxidační účinky silybinu | 20 |
| 2.7 Stanovení antioxidační aktivity | 21 |
| 2.7.1 Redukce <i>N,N</i>-difenyl-<i>N'</i>-pikrylhydrazylvého radikálu (DPPH test) | 21 |
| 2.7.2 Inhibice mikrosomální lipoperoxidace | 22 |
| 3 CÍL PRÁCE | 23 |
| 4 MATERIÁL A METODY | 24 |
| 4.1 Použité chemikálie | 24 |
| 4.2 Použité přístroje | 25 |
| 4.3 Použité metody | 25 |
| 4.3.1 Tenkvrstvá chromatografie (TLC) | 25 |
| 4.3.2 Preparativní sloupcová chromatografie na silikagelu | 26 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 4.4 | Syntéza derivátů silybinu | 26 |
| 4.4.1 | Příprava chloridů kyselin | 26 |
| 4.4.2 | Příprava esterů silybinu – metoda A | 26 |
| 4.4.3 | Příprava esterů silybinu – metoda B | 27 |
| 4.5 | Stanovení antioxidační aktivity esterů silybinu | 28 |
| 4.5.1 | Zhášení <i>N,N</i> -difenyl- <i>N'</i> -pikrylhydrazylového radikálu (DPPH test) | 28 |
| 4.5.2 | Inhibice lipoperoxidace | 28 |
| 5 | VÝSLEDKY | 30 |
| 5.1 | Redukce <i>N,N</i>-difenyl-<i>N'</i>-pikrylhydrazylového radikálu | 30 |
| 5.1.1 | Vyhodnocení DPPH testu | 30 |
| 5.2 | Inhibice lipoperoxidace | 31 |
| 6 | DISKUZE | 33 |
| 7 | ZÁVĚR | 35 |
| 9 | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | 36 |

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

| | |
|-------------|--|
| Ac | acetyl |
| CD | cirkulární dichroismus |
| DMSO | dimethylsulfoxid |
| ekv. | ekvivalent |
| Et | ethyl |
| ESI MS | Electrospray Ionization Mass Spectrometry |
| GSH | glutathion |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography |
| LDL | low density lipoprotein |
| MALDI MS | Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometer |
| Me | methyl |
| MeOH | methanol |
| MS | hmotností spektrometrie |
| DPPH | <i>N,N</i> -difenyl- <i>N'</i> -pikrylhydrazyllový radikál |
| NMR | nukleární magnetická rezonance |
| ppb | part per bilion |
| RNS | Reactive Nitrogen Species |
| ROS | Reactive Oxygen Species |
| <i>t</i> BH | <i>tert</i> -butylhydroperoxid |
| TLC | Thin Layer Chromatography |
| TBA | thiobarbiturová kyselina |
| TPP | trifenylfosfin |
| TPPO | trifenylfosfinoxid |
| TCA | trichloroctová kyselina |

1 ÚVOD

Flavonolignan silybin je majoritní složkou tzv. silymarinu, což je směs polyfenolických látek izolovaná ze semen ostropestřce mariánského (*Silybum marianum*). Kromě silybinu obsahuje silymarin také další flavonolignany jako isosilybin, silydianin, silychristin a 2,3-dehydrosilybin, flavonoidy taxifolin a kvercetin a směs polymerních fenolických látek.^[1]

Silybin se využívá především jako hepatoprotektivum,^[2] ale je to také účinný antioxidant, ovlivňuje vylučování toxických látek z organismu a má uplatnění také jako doplňková látka při chemoterapii nádorových onemocnění.^[1]

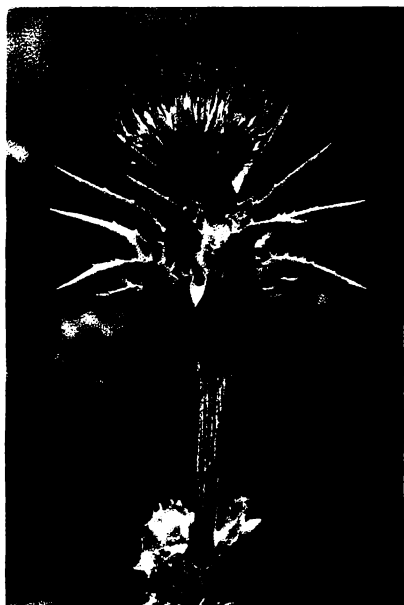
Biologická dostupnost a tedy i terapeutická účinnost silybinu je omezena jeho nízkou rozpustností ve vodě (430 mg.l⁻¹). Modifikace silybinu spojené se zvýšením jeho rozpustnosti ve vodě zlepšují sice jeho biodostupnost, vždy jsou však doprovázeny podstatným snížením jeho antioxidační (anti-lipoperoxidační) aktivity. Pravděpodobným vysvětlením tohoto chování polárních derivátů silybinu je skutečnost, že silybin díky své amfifilní povaze působí převážně v místech fázového rozhraní voda - lipidová dvojvrstva, tedy na povrchu lipidických kompartmentů buněk.^[3] Zvýšení polaritý molekuly silybinu tak vede ke snížení jeho afinity k těmto buněčným strukturám, což vede ke snížení aktivity takto modifikovaného derivátu oproti silybinu. Esterifikace silybinu mastnými kyselinami spojená se zvýšením jeho hydrofobity by naopak mohla vést k zesílení afinity těchto derivátů silybinu k povrchu biomembrán, což by mohlo vést ke zvýšení biologické aktivity těchto derivátů ve srovnání se silybinem. Pro zachování antioxidační aktivity zamýšleného acyl derivátu silybinu je nezbytné vést esterifikaci selektivně do poloh, které nejsou zodpovědné za tuto aktivitu. Jako nejvýhodnější se z tohoto hlediska jeví polohy 7-OH a 23-OH. V rámci této práce byla připravena série esterů silybinu substituovaných v polohách 7-OH a 23-OH mastnými kyselinami s různou délkou řetězce a byl studován vliv polohy substituce silybinu a délky řetězce mastné kyseliny na antioxidační (anti-lipoperoxidační) aktivitu.

Tato práce navazuje na práci Ing. Radka Gažáka, PhD (Selektivní modifikace silybinu-disertační práce) a Ing. Lucie Živné (Selektivní esterifikace silybinu-diplomová práce).

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Ostropestřec mariánský (*Silybum marianum*)

Zdrojem silybinu je ostropestřec mariánský (*Silybum marianum*), který byl pro své hepatoprotektivní účinky využíván již ve starověku. Tato rostlina je původem ze



Obrázek 1: Ostropestřec mariánský (*Silybum marianum*)

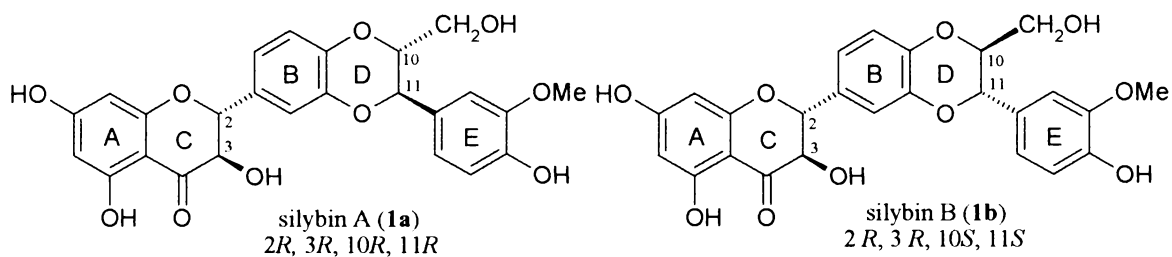
Středomoří, od 70. let se však pěstuje i v České republice. Ostropestřec mariánský (*obrázek 1*) je druh z čeledi *Asteraceae* (hvězdnicovité). Semena o. mariánského obsahují směs flavonolignanů, flavonoidy, lipidy, sacharidy, saponiny a vitaminy.^[1,4] Extrakci částečně odtučněných semen acetonem (případně ethanolem, methanolem nebo ethyl-acetátem) se získává surový extrakt (tzv. silymarin)^[2] obsahující flavonolignany (včetně silybinu) a polymerní fenolické látky. Acetonový extrakt se zahustí ve vakuu a zbývající tuk se odstraní vytřepáním hexanem. Při vytřepávání zároveň dochází k vysrážení surového silymarinu. Čistý silybin se získává ze silymarinu krystalizací z ethanolu s přídavkem 10 % vody

a dočištěním rekrystalizací z absolutního ethanolu.

2.2 Složení silymarinu

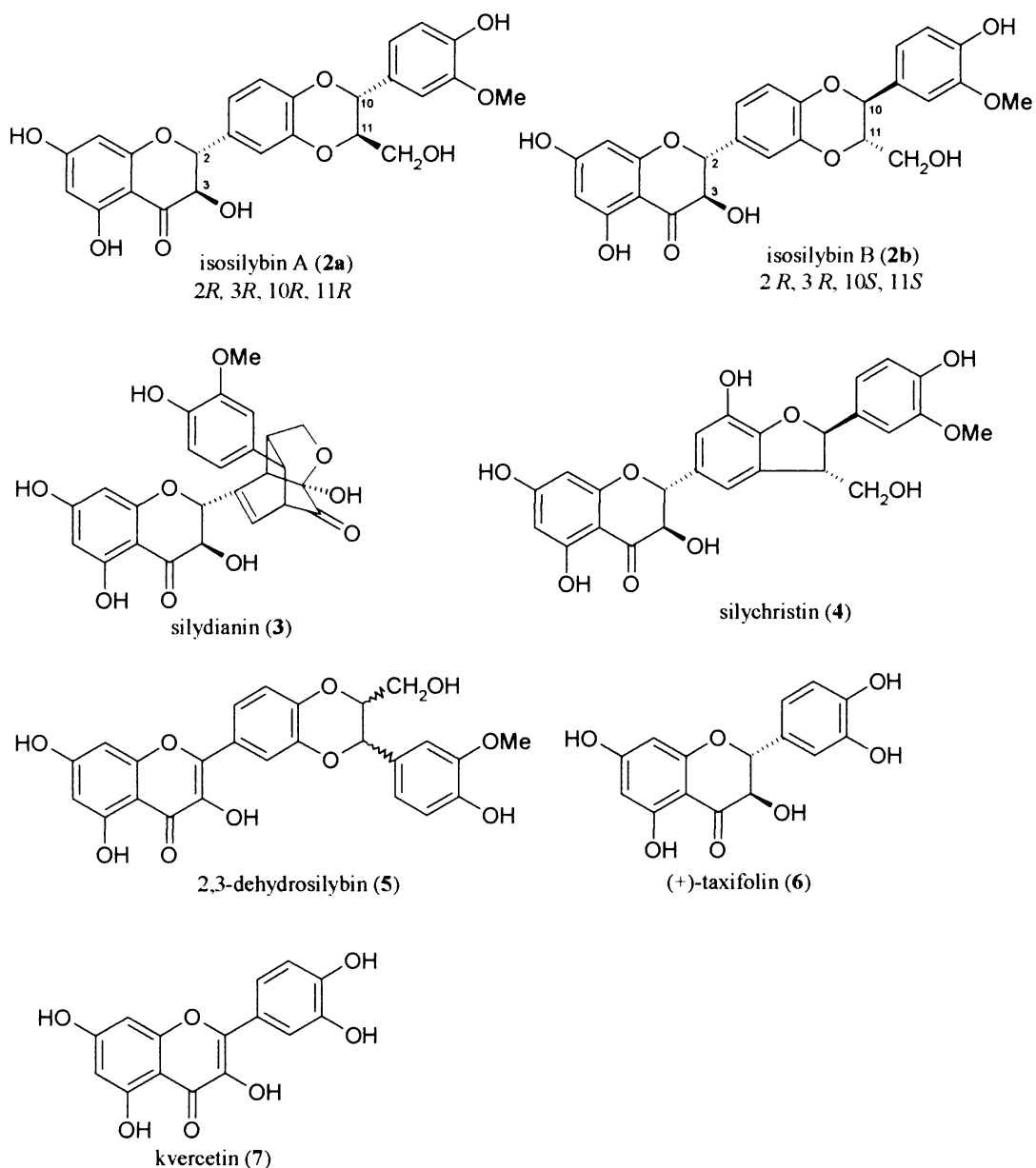
Přečištěný extrakt ze semen *S. marianum* pojmenoval Wagner^[5,6] v roce 1974 jako silymarin. Jeho přesné chemické složení zatím není zcela známé, neboť kromě frakce tvořené flavonolignany (70 – 80 %) obsahuje také frakci polymerních fenolických sloučenin (20 – 30 %). V závislosti na kultivaru *S. marianum* se podíl těchto frakcí v extraktu mění. Hlavní složkou silymarinu je silybin^[1] (přes 30 %), který je tvořen směsí dvou diastereoizomerů A a B zastoupených v poměru přibližně 1:1 (*obrázek 2, str.9*). Silybin A (**1a**) má absolutní konfiguraci 2*R*, 3*R*, 10*R*, 11*R* a jeho systematický název je (2*R*,3*R*)-2-[(2*R*,3*R*)-2,3-dihydro-3-(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)-2-(hydroxymethyl)-1,4-benzodioxin-6-yl]-2,3-dihydro-3,5,7-trihydroxy-4*H*-1-benzopyran-4-on, silybin B (**1b**) má

absolutní konfiguraci $2R, 3R, 10S, 11S$ a systematický název $(2R, 3R)$ -2-[($2S,3S$)-2,3-dihydro-3-(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)-2-(hydroxymethyl)-1,4-benzodioxin-6-yl]-2,3-dihydro-3,5,7-trihydroxy-4*H*-1-benzopyran-4-on.^[4,7]



Obrázek 2: Struktura diastereoizomerů silybinu a jejich absolutní konfigurace (číslování použité zde je odlišné od číslování používaného při tvorbě systematických názvů)

Další složky silymarinu jsou flavonolignany isosilybin (**2**), silydianin (**3**), silychristin (**4**) a 2,3-dehydrosilybin (**5**) a flavonoidy taxifolin (**6**) a kvercetin (**7**) (*obrázek 3, str. 10*).



Obrázek 3: Další složky silymarinu

2.3 Diastereoizomery silybinu a jejich dělení

Stereochemie flavonolignanů silymarinu byla objasněna pomocí CD-spekter,^[4] NMR spekter a rentgenostrukturní analýzy. Tento typ látek má chirální centra na uhlicích C-2, C-3 (kruh C) a C-10, C-11 (kruh D). Silybin je směs diastereoizomerů, které lze jen velmi obtížně separovat. Není možné je oddělit klasickými separačními metodami jako je chromatografie na silikagelu či krystalizace. Je však možné použít semipreparativní dělení. Využívá se buď preparativní HPLC^[4] a nebo se vychází z glykosidů silybinu, které jsou na

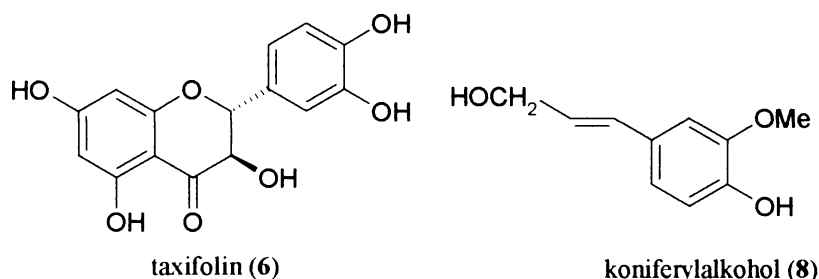
rozdíl od samotného silybinu dělitelné pomocí preparativní sloupcové chromatografie na silikagelu. Čisté diastereoizomery silybinu se po separaci získají enzymovou hydrolyzou cukerné složky příslušného glykosidu silybinu. Směs silybinu A a B krystalizuje ve formě směsných mikrokystalů, obsahujících prakticky ekvimolární poměr obou diastereoizomerů.

Chemie silybinu se provádí výlučně s přírodním (směsným) silybinem, protože čisté diastereoizomery silybinu A a B jsou k dispozici pouze v malém množství - v desítkách mg. Reaktivita obou diastereoizomerů je prakticky stejná a doposud nebyly nalezeny žádné rozdíly. Pokud však jde o jakoukoli interakci s anisotropním prostředím (např. receptory, proteiny apod.), je nutné použít opticky čistých látek.

Novou možnou metodou je dělení pomocí enzymů. Slibnou metodou, která by mohla poskytnout významnější množství čistých diastereoizomerů silybinu, je využití enzymů schopných selektivního štěpení vhodně modifikovaného silybinu (směsi tvořené stejným derivátem silybinu A a B). V současnosti probíhá testování lipas schopných selektivní hydrolyzy esterů silybinu.

2.4 Biosyntéza silybinu a jeho chemická syntéza

Pro strukturu flavonoidů je charakteristický fenylochromanonový skelet s navázanými hydroxylovými skupinami. Flavonolignany vznikají kondenzací flavonoidu taxifolinu (6) s koniferylalkoholem (8),^[8,9] od čehož je také odvozen jejich název, neboť koniferylalkohol (8) tvoří spolu se sinapylalkoholem a *p*-kumarylalkoholem základní stavební kameny ligninu (obrázek 4).



Obrázek 4: Stavební kameny flavonolignanů

V roce 1977 byla provedena syntéza silybinu kondenzací taxifolinu (6) s koniferylalkoholem (8) s použitím suspenzní kultury *Silybum marianum*.^[10] Byl také

navržen možný mechanismus kondenzace obou stavebních jednotek katalyzovaný peroxidasou (*Schéma 1, str. 13*). Všechny látky ze skupiny silymarinu (kromě silydianinu, který jako jediný známý tvoří isostereomer) jsou diastereoizomery^[11] a u všech platí, že jejich vicinální chirální centra jsou ve vzájemném *trans* uspořádání. Jedná se o hydroxymethylovou skupinu a substituovanou fenylovou skupinu na dioxanovém (popř. tetrahydrofuranovém) kruhu. Jelikož reakce látek **6** a **8** není stereoselektivní, vzniká směs dvou diastereoizomerů (*Schéma 1*). Ostatní flavonolignany vznikají rovněž reakcí těchto dvou látek, ale jiným mechanismem.

Kromě zmíněné biomimetické syntézy silybinu^[10] byla také publikována jeho totální syntéza,^[12] která však vedla ke směsi 4 diastereoizomerů, z nichž pouze dva byly identické s přírodním silybinem (směsí silybinu A a B).

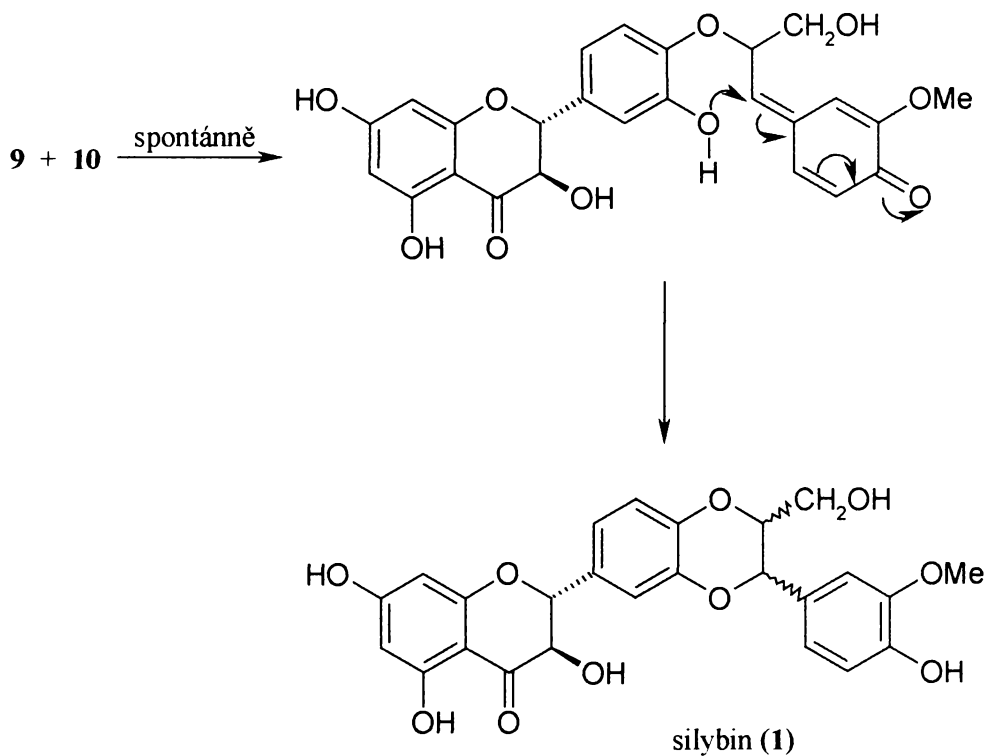
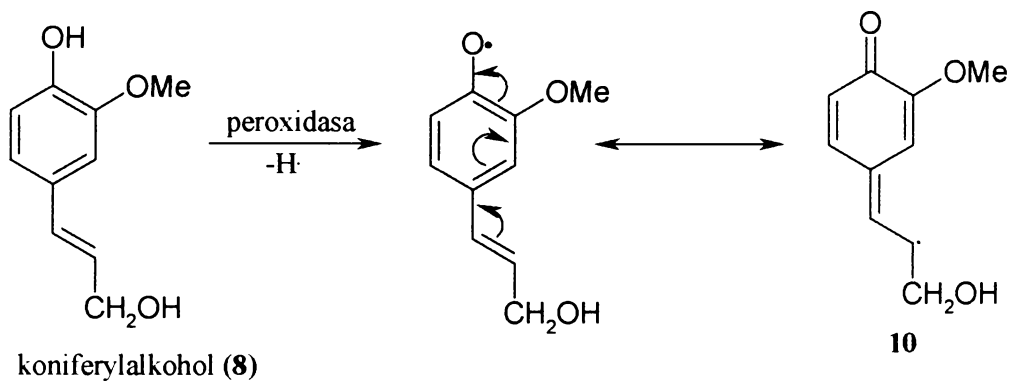
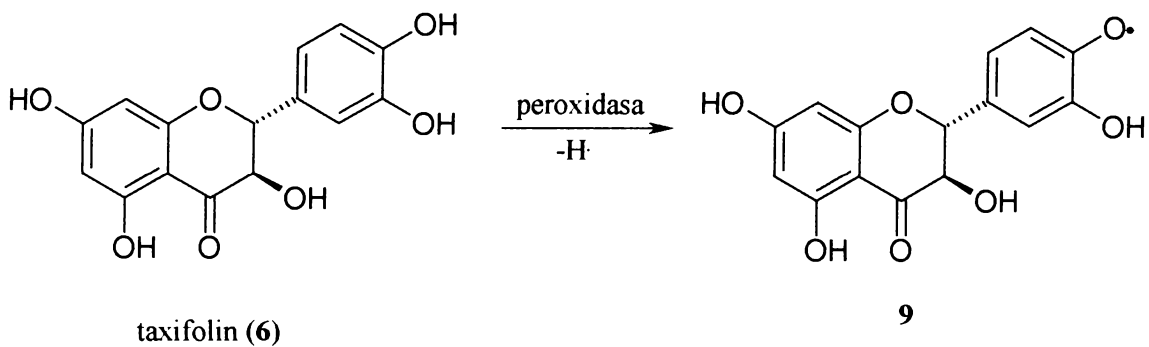


Schéma 1

Biosyntéza taxifolinu (6) je spojena s hlavními biosyntetickými drahami, které využívají prekursory šikimátové a acetát-malonátové dráhy (Schéma 2, str. 14).^[13]

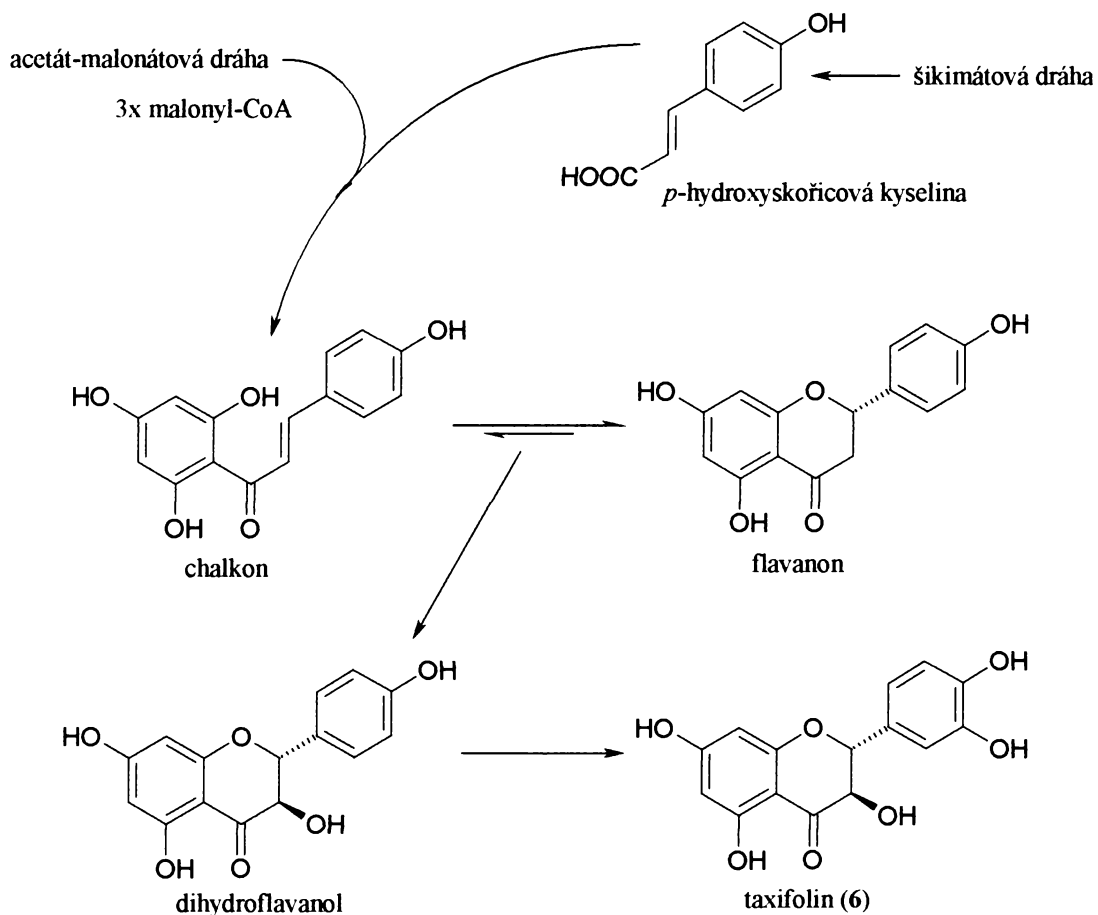


Schéma 2

Biosyntéza koniferylalkoholu (8) vychází z kyseliny šikimové (Schéma 3).^[14]

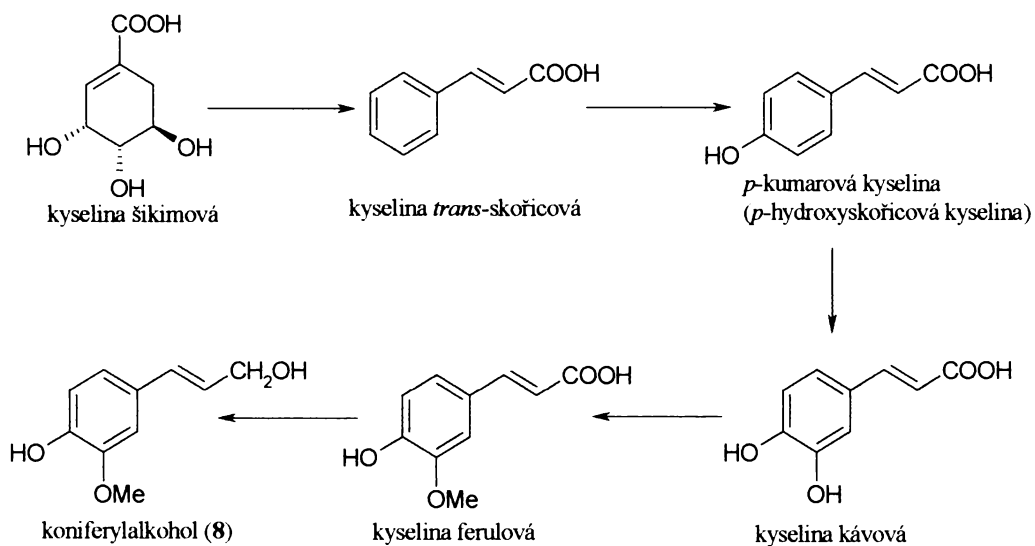


Schéma 3

2.5 Semisyntetické deriváty silybinu

Nízká rozpustnost silybinu ve vodě (430 mg/l) značně limituje jeho biologickou a terapeutickou účinnost. Proto byly připraveny hydrofilní deriváty silybinu jako jsou 3,23-*O*-Bishemisukcinát silybinu (Legalon-SIL, Madaus),^[15] silybin-23-*O*-fosfát,^[16] 23-*O*-glykosidy silybinu (β -D-glukopyranosid, β -D-galaktopyranosid, β -laktosid a β -maltosid)^[17] a karboxylové kyseliny, získané selektivní oxidací silybinu a 2,3-dehydrosilybinu.^[18] 3,23-*O*-Bishemisukcinát silybinu je komerční léčivo, které se díky dobré rozpustnosti ve vodě používá intravenózně při léčbě akutních otrav mykotoxiny, protože působí na receptory, které zprostředkovávají vstup mykotoxinů do buněk. Ostatní hydrofilní deriváty silybinu nedosáhly komerčního využití, neboť přes jejich lepší rozpustnost ve vodě jsou jejich biologické účinky (především cytoprotektivní a antiradikálové) podstatně nižší ve srovnání se silybinem.

Nyní se pro zlepšení biodostupnosti používá nových postupů, které využívají toho, že lipofilní deriváty dobře vstupují do lipidických kompartmentů, například lipofilní nekovalentní komplex silybinu s fosfatidylcholinem (IdB 1016, Indena, I).^[19]

2.6 Biologické účinky silybinu (silymarinu)

Ostropestřec mariánský je používán již od starověku. Jako přírodní léčivo se používá na zažívací problémy gastrointestinálního traktu, nemoci žlučníku a jater, při menstruačních obtížích a křečových žilách. Běžně se extrakt ze *S. marianum* používá pro léčbu cirhózy, chronické hepatitidy a nemoci jater spojené s nadměrnou konzumací alkoholu či vystavení přírodním toxinům.^[20] Silybin působí na mnoha úrovních, například jako inhibitor glukuronidasy a antioxidant.

Vzhledem k majoritnímu zastoupení silybinu v silymarinu lze předpokládat, že za velkou část biologických účinků je zodpovědný právě silybin, což bylo také mnohokrát prokázáno výsledky biologických testů s čistým silybinem ve srovnání se silymarinem.^[11] *In vivo* chrání silybin játra proti různým jedům, např. proti allylalkoholu, hepatotoxinům muchomůrky zelené (*Amanita phalloides*) - phalloidinu^[21,22] a α -amanitinu,^[23] dále pak tetrachlormethanu,^[24] galaktosaminu a thioacetamidu.^[25] Využívá se také proti nežádoucím účinkům radioaktivity,^[26] toxickému působení iontů železa^[27] a při virové hepatitidě.^[28]

Silybin působí jako antioxidant,^[27] zvyšuje vylučování toxických látek z organismu^[29] a inhibuje tvorbu leukotrienů z polynenasycených mastných kyselin díky inhibici lipoxygenasy.^[30] Zvyšuje také syntézu proteinů hepatocytu a ovlivňuje imunitní systém. Silybin má také pozitivní účinky na kůži a je vhodný pro její ochranu například při vystavení kůže UV záření a při bezpočtu kožních poruch, jako jsou otoky, spálení pokožky slunečními paprsky, hyperplazie, imunosuprese, poškození DNA, stárnutí kůže vlivem UV záření, melanogeneze a rakovina kůže.

Pro svou cytoprotektivní aktivitu je silybin také využíván jako chemoprotektivum, které inhibuje karcinogenní účinky mnoha chemikálií.^[31] Například prokazatelně snižuje výskyt nádoru močového měchýře a přednádorových lézí v iniciační nebo postiniciační fázi, které vyvolává *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)-nitrosamin.^[32] Dále také snižuje karcinogenezi tlustého střeva u potkanů, vyvolanou azoxymethanem.^[33]

Za posledních pět let bylo publikováno více než 400 prací zabývajících se biologickými účinky silybinu, popř. silymarinu, přesto však bývá v literatuře často zaměňován silybin (čistá látka) za silymarin (komplex) a opačně.^[34] Silybin resp. silymarin je považován za bezpečné léčivo, neboť doposud nebyly zjištěny žádné vedlejší či negativní účinky na lidský organizmus.^[35] Částečně je to dáno nízkou rozpustností flavonolignanů ve vodě, takže je víceméně nemožné dosáhnout toxické koncentrace silybinu *in vivo*. Často také bývají opomíjeny aspekty související s optickou čistotou silybinu i ostatních flavonolignanů silymarinu. Proto je vhodné připomenout, že pokud se jedná o jiné použití silybinu (silymarinu) než antioxidační v isotropním prostředí, je nutné brát v úvahu stereochemii daných látek.

2.6.1 Antihepatotoxická aktivita silybinu vůči působení xenobiotik

Před vyloučením xenobiotika z organismu dochází často k jeho metabolickým přeměnám, vedoucím k jeho snadnější eliminaci. Nejprve dochází k metabolické aktivaci, což je tzv. první fáze biotransformace. Obvykle se jedná o oxidačně-redukční děj, při němž hraje významnou roli komplex oxidoreduktáz obsahující cytochrom P450. Při druhé fázi biotransformace např. tvorbě glukosiduronátů xenobiotik dochází ke zvýšení polaritě xenobiotika. Po aktivaci mohou z xenobiotik vznikat vysoce toxické reaktivní radikály, způsobující peroxidaci lipidů a následně destrukci hepatocytu.

Mechanismus antihepatotoxického působení silybinu je dvojitý. Za prvé omezuje metabolickou aktivaci daného xenobiotika inhibicí cytochromu P450. Za druhé má silybin

schopnost zhášet volné radikály (free radical scavenger) a přerušit tak řetězovou oxidační reakci (chain-breaking antioxidant).

Inhibice cytochromu P 450

V testech *in vivo* na zvířecích modelech (myších) silybin inhiboval aktivitu několika specifických cytochromů P450.^[29] Z posledních studií vyplývá, že silybin a 2,3-dehydrosilybin inhibují cytochrom P450 1A1 v lidských jaterních buňkách a keratinocytech. Tyto efekty mohou vysvětlit některé z hepatoprotektivních účinků silybinu (silymarinu).^[36]

Toxické působení tetrachlormethanu spočívá v jeho redukční dehalogenaci cytochromem P450 na volný trichlormethylový radikál $\text{CCl}_3\cdot$, čímž dochází k jeho metabolické aktivaci (Schéma 4, str. 18). Tento radikál bezprostředně reaguje s kyslíkem za vzniku trichlormethylperoxylového radikálu.^[37] Následně pak dochází k odtržení atomu vodíku z nenasycených lipidů a k tvorbě lipidových radikálů s radikálovým centrem na atomu uhlíku. Lipidový radikál rychle přijímá molekulární kyslík a vzniká lipidový peroxyradikál, čímž je iniciována řetězová oxidace lipidů, která vede k destrukci buněčných struktur hepatocytu. Snížená metabolická aktivace tetrachlormethanu omezuje tvorbu trichlormethylového radikálu, a tím je také následně omezena oxidace lipidů. Tento mechanismus se uplatňuje u látek, které podléhají radikálovým reakcím (např. nenasycené mastné kyseliny). Tato inhibiční schopnost byla prokázána *in vitro* na aktivitách několika monooxygenas.

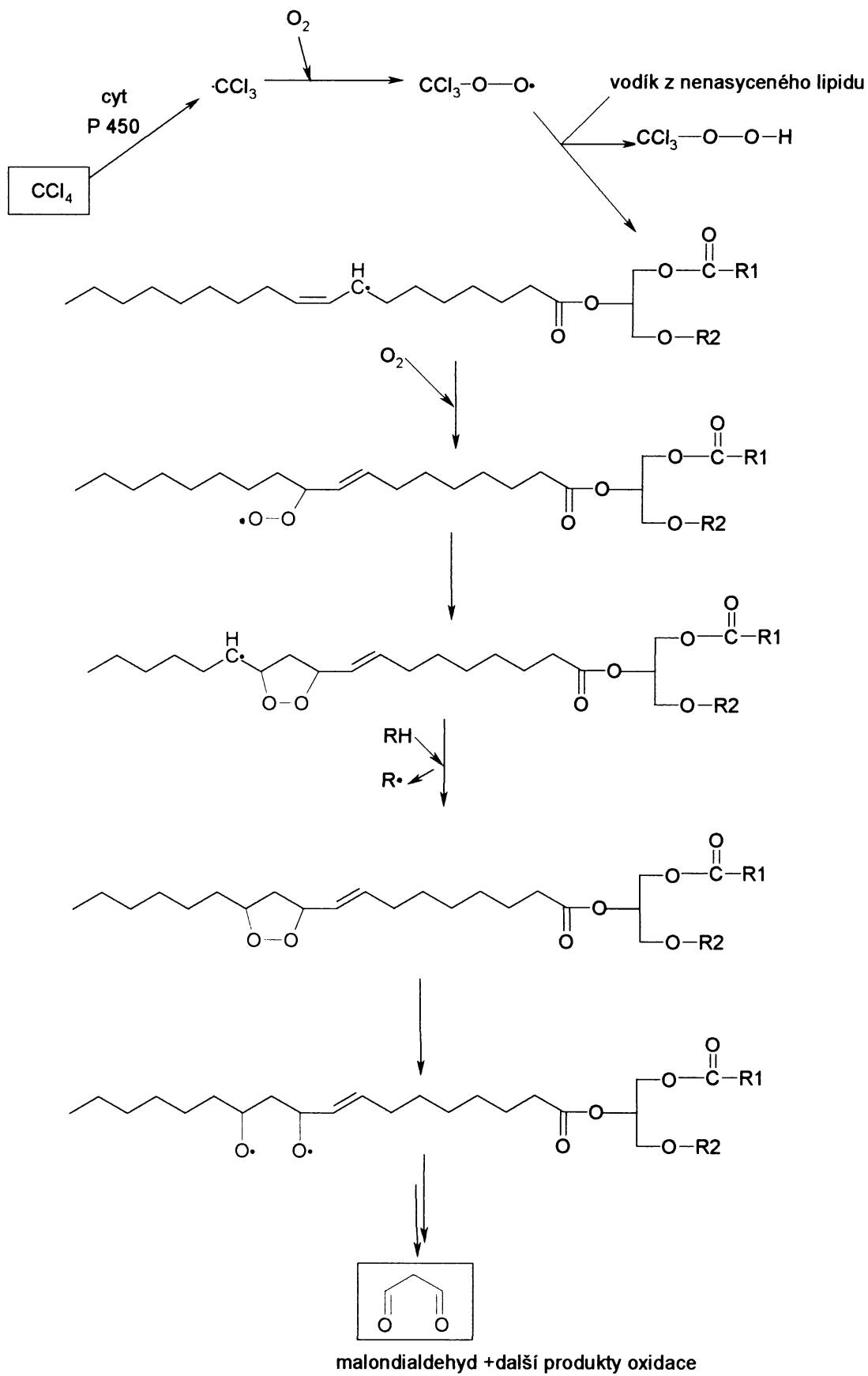


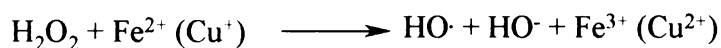
Schéma 4

2.6.2 Antioxidační účinky flavonoidů

Oxidační stres

Oxidační stres je definovaný jako nerovnováha mezi oxidačním a antioxidačním systémem, což může vést až k potenciálnímu poškození tkání. Vzniká tedy jako důsledek oxidačních procesů v buňce, které vyvolávají reaktivní formy kyslíku (ROS - reactive oxygen species) a dusíku (RNS - reactive nitrogen species). ROS vznikají různými redoxními reakcemi molekulárního kyslíku, často za katalýzy přechodnými kovy jako je železo nebo měď a mají tendenci reagovat s dalšími molekulami, nejčastěji s nenasycenými mastnými kyselinami a/nebo s postranními řetězci aminokyselin. Mezi ROS patří zejména superoxidový radikál ($O_2^{\cdot-}$), peroxid vodíku (H_2O_2), hydroxylový radikál ($HO\cdot$) a singletový kyslík. Je však nutné podotknout, že přestože jsou ROS toxické, bývají tyto látky záměrně tvořeny organismy jako obranná odpověď na stresové podněty (např. napadení patogeny), či bývají používány jako signální molekuly. Živé organismy si v průběhu generací vyvinuly unikátní systém regulace ROS, čímž se brání nechtěnému poškození vlastních buněk. ROS jsou vysoce reaktivní, proto oxidují lipidy, proteiny a DNA, což vede při nedostatku antioxidantů (ať už endogenních či exogenních) k oxidačnímu stresu. Reaktivní formy kyslíku mohou způsobovat poškození buněk několika způsoby: 1. tvorba modifikovaných biomolekul vede k poškození buněčné funkce, 2. tvorba toxických forem jako jsou peroxidy, aldehydy a ketony, 3. změna biologických molekul může vést k přehnané imunitní odpovědi a následně k autoimunitním onemocněním, 4. oxidanty mohou změnit signální kaskádu (dráhu) uvnitř buněk, což může vést k další potenciaci zmíněných efektů.

Hlavními zdroji volných radikálů jsou bílé krvinky (produkují ROS při napadení patogeny), mitochondriální dýchací řetězec, biotransformace xenobiotik v endoplazmatickém retikulu hepatocytu, Fentonova nebo Haberova-Weisova reakce přechodných kovů^[38] (obrázek 5). Vznikají však také například účinkem UV záření či ionizujícím zářením.



Obrázek 5: Fentonova (Fe) a Haberova-Weisova reakce (Cu)

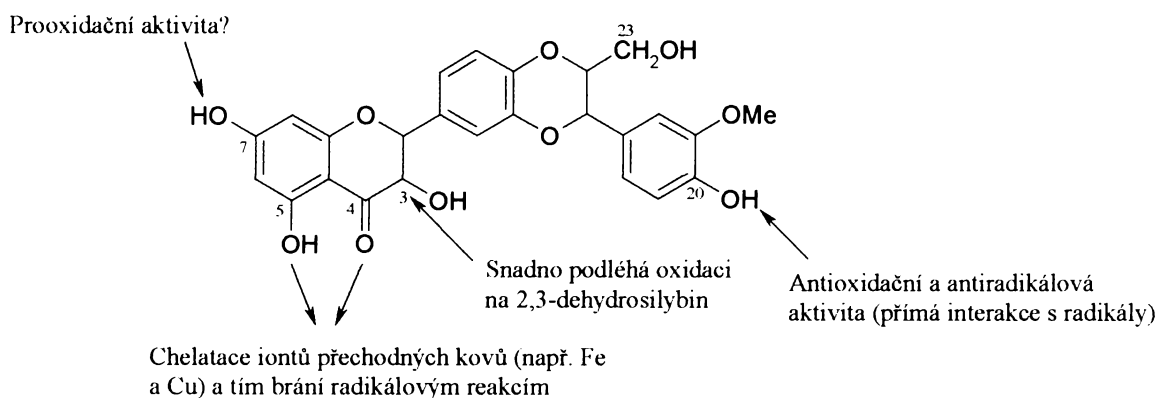
Antioxidanty chrání biologické systémy před účinky volných radikálů. Dělí se na antioxidační enzymy (např. peroxidasa, superoxiddismutasa, katalasa) a antioxidační (nízkomolekulární) látky, které jsou buď lipofilní (rozpuštěné v tucích, např. vitamin A, E) nebo hydrofilní (rozpuštěné ve vodě, např. vitamin C, flavonoidy, thioly, kyselina močová a glutathion).

2.6.3 Antioxidační účinky silybinu

Antioxidační vlastnosti silybinu a flavonoidních látek vůbec jsou dány tím, že potlačují vznik reaktivních sloučenin kyslíku a dusíku (ROS a RNS).^[39,40] V podstatě používají dvojí mechanismus, buď vychytávají volné radikály nebo inhibují enzymy produkující, popř. spojené s produkcí ROS (xanthinoxidasu, proteinkinasu C,^[41] cyklooxygenasu, lipoxxygenasu, NADH oxidasu atd.).

Mnoho flavonoidů včetně silybinu také účinně chelatuje ionty přechodných kovů, které hrají důležitou roli v metabolismu kyslíku, hlavně ionty železa a mědi. Železo i měď jsou sice biologicky významné kovy mající důležité fyziologické funkce (součást hemoproteinů a kofaktorů různých enzymů), které se za fyziologických podmínek nevyskytují v organismu volné, ale pevně vázané v proteinech (hem, ceruloplasmin atd.), avšak při patologických stavech se uvolňují a působí škodlivě.

Bylo zjištěno, že jednotlivé hydroxylové skupiny silybinu působí rozdílnými antioxidačními mechanismy (*obrázek 6, str. 21*), což přispívá k jeho relativně vysoké antioxidační aktivitě.^[43] Za antiradikálovou aktivitu silybinu je především zodpovědná skupina 20-OH (přímá interakce s volnými radikály), zatímco 7-OH vykazuje, zejména při vyšších koncentracích, aktivitu pro-oxidační, tzn. že řetězovou radikálovou reakci nezpomaluje, ale naopak urychluje. Významná je také úloha skupiny 5-OH, která má spolu s karbonylovou skupinou v poloze C-4 chelatační vlastnosti (chelatuje ionty Fe a Cu, čímž zabraňuje pro-radikálovým reakcím typu reakce Fentonovy). Poloha C-3 poměrně snadno oxiduje za vzniku 2,3-dehydrosilybinu, což je derivát silybinu s výrazně vyšší antiradikálovou aktivitou.

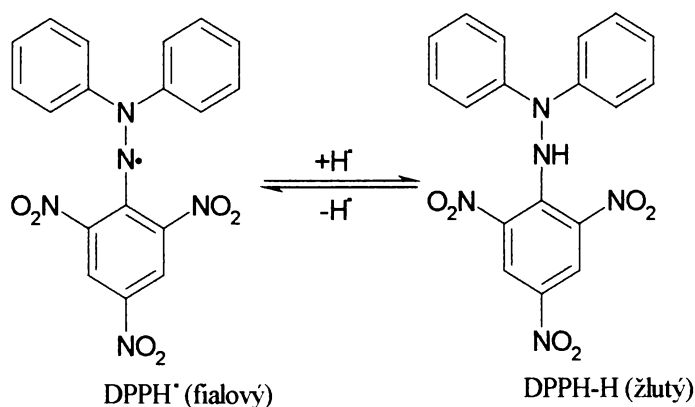


Obrázek 6: Úloha jednotlivých hydroxylových skupin silybinu v mechanismu jeho antioxidačního působení (převzato z 42)

2.7 Stanovení antioxidační aktivity

2.7.1 Redukce *N,N*-difenyl-*N'*-pikrylhydrazylového radikálu (DPPH test)

Pro orientační stanovení antioxidačního účinku lze v první řadě použít zhášení (redukci) stabilního *N,N*-difenyl-*N'*-pikrylhydrazylového radikálu (DPPH). Jedná se o metodu, která poskytuje informaci o antioxidačních vlastnostech měřených látek (obrázek 7, str. 22), kde změna absorbance, ke které dochází při redukci DPPH přítomným antioxidantem, je závislá na míře antioxidačního působení měřené látky. Je nutné podotknout, že zde hraje důležitou roli teplota a doba působení měřené látky. Tato metoda měření antioxidačních vlastností však neposkytuje žádnou informaci o tom, co se s měřenou látkou při radikálové reakci děje. Přestože je tato metoda všeobecně uznávána pro hodnocení antioxidačního potenciálu přírodních látek *in vitro*,^[43-47] vzhledem k tomu, že DPPH není fyziologicky se vyskytující radikál a stanovení se navíc provádí v methanolu a nikoliv ve vodě, nelze brát výsledky tohoto stanovení antioxidační aktivity za zcela jednoznačné. Chování antioxidantů *in vivo* je díky jejich komplexnímu mechanismu působení často zcela odlišné od závěrů vyplývajících z DPPH testu.^[48] Teprve kombinací dvou a více vzájemně nezávislých metod stanovení antioxidační aktivity látek a jejich kritickým porovnáním lze získat pravděpodobnou informaci o antioxidační účinnosti dané látky v živém (lidském) organismu.



Obrázek 7: Radikálová reakce s DPPH (redukce DPPH)

2.7.2 Inhibice mikrosomální lipoperoxidace

Pro detailnější ověření antioxidační aktivity nových derivátů silybinu lze studovat protektivní účinek na mitochondriální a mikrosomální membrány potkaních jaterních buněk. Oba typy membrán jsou vhodným modelem pro hodnocení protektivity vůči lipoperoxidačnímu poškození. Membránové hydrofobně-hydrofilní rozhraní je považováno za klíčové místo pro protektivní účinek fenolických látek, včetně silybinu a jeho derivátů.^[3] Schopnost fenolických kyselin^[49] a flavonoidů^[50] inhibovat lipoperoxidaci modelových membrán, popřípadě LDL („low density lipoprotein“-lipoproteiny o nízké hustotě) je v literatuře velmi dobře dokumentována. Mechanismem inhibice lipoperoxidace v membránách je zabránění řetězové reakci interakcí antioxidantu s volným radikálem. V prevenci lipoperoxidačního poškození se vedle antioxidačního efektu projevuje rozdělovací koeficient a prostorová orientace antioxidantu na membránovém rozhraní. Výsledky měření samozřejmě také ovlivňuje hydrofobita resp. hydrofilita měřených látek, protože hydrofilita látek snižuje afinitu těchto látek k lipidovému rozhraní.^[51] Obvykle se hodnotí lipoperoxidace mitochondriální nebo mikrosomální membrány, která je indukována *tert*-butylhydroperoxidem. Vznikající produkty peroxidace lipidů tvoří s kyselinou thiobarbiturovou barevné komplexy, které se stanovují spektrofotometricky.^[52]

3 CÍL PRÁCE

Základní cíle předkládané bakalářské práce byly následující:

1. Shromáždění základních informací o flavonolignanu silybinu zaměřených především na jeho antioxidační (popř. antiradikálovou) aktivitu
2. Příprava série 7-*O*- a 23-*O*-acyl derivátů silybinu s nasycenými karboxylovými kyselinami s různě dlouhým řetězcem (např. butyrát, oktanoát, dodekanoát a palmitát) v dostatečném množství pro následné studie antioxidační aktivity.
3. Takto připravené deriváty následně testovat na jejich antioxidační aktivitu pomocí DPPH testu a inhibici mikrosomální lipoperoxidace. Dále pak z výsledků měření posoudit, zda má na antioxidační aktivitu vliv délka řetězce karboxylové kyseliny a poloha substituce silybinu.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Použité chemikálie

Silybin (přírodní, směs diastereoisomerů A a B v poměru přibližně 1:1) - *TEVA-Galena, Opava (ČR)* - čistota byla určována pomocí HPLC, v případě potřeby byl silybin přečištěn rekrytalizací z absolutního ethanolu. Silybin byl vysušen azeotropní destilací s toluenem (pro odstranění krystalicky vázané vody) a uchováván v exikátoru nad P₂O₅.

Mastné kyseliny a jejich deriváty: butanoylchlorid, kyselina oktanová, kyselina dodekanová, palmitoylchlorid - vše *Aldrich (USA)*

Ostatní chemikálie:

Diethyletherát fluoridu boritého (50 % roztok v diethyletheru), oxalychlorid (2 mol.l⁻¹ v dichlormethanu), kyselina mravenčí (95 %, p.a.), *terc*-butylhydroperoxid, kyselina thiobarbiturová, kyselina trichloroctová – *Aldrich (USA)*,

molekulární síto 4Å – *Merck (SRN)*,

reagencie pro stanovení proteinů podle Bradfordové ¹⁵⁷¹ – *BioRad (USA)*,

NaHCO₃ (p.a.), Na₂SO₄ (p.a., bezv.), HCl (35 – 38 %), KCl, EDTA, sacharosa, NaCl - *Lachema (ČR)*,

N,N-difenyl-*N'*-pikrylhydrazylový radikál (DPPH), tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) – *Loba Feinchemie (Rakousko)*

Všechny chemikálie byly čistoty p.a. nebo vyšší.

Rozpouštědla: Ethyl-acetát, chloroform, ethanol, toluen, dichlormethan, acetonitril, dimethylsulfoxid - *Penta (ČR)*, pyridin (suchý) - *Fluka (Švýcarsko)*, methanol - *Merck (SRN)*.

Všechna rozpouštědla určená pro chemické syntézy (s výjimkou pyridinu) byla před použitím upravena následujícím postupem:

Toluen byl sušen sodíkem (5 g Na na 1 l toluenu) a před použitím byl destilován za přítomnosti sodíku pod argonem.

Dichlormethan byl sušen nad CaH_2 (5 g CaH_2 na 1 l CH_2Cl_2) a destilován z hydridu vápenatého pod argonem a uchován nad molekulovými sítí 4Å.

Acetonitril sušen nad CaH_2 (5 g CaH_2 na 1 l CH_3CN) a destilován z hydridu vápenatého pod argonem a uchován nad molekulovými sítí 4Å.

Aceton byl sušen nad bezvodým CaCl_2 (10 g CaCl_2 na 1 l acetonu) 12 hodin a bezprostředně před použitím byl destilován z CaCl_2 .

Ostatní rozpouštědla byla před použitím předestilována, popř. použita bez další úpravy (pokud to umožňovala deklarovaná čistota).

Biologický materiál:

Jako zdroj jaterní tkáně pro izolaci mikrosomální frakce potkaních hepatocytů sloužili laboratorní potkani kmene Wistar (dvouměsíční samice o hmotnosti 200-250 g) s neomezeným přístupem k potravě (standardní laboratorní dieta).

Pro tenkovrstvou chromatografii (TLC) byl použit silikagel 60 F₂₅₄ na hliníkové fólii – *Merck (SRN)*.

Pro preparativní sloupcovou chromatografii byl použit silikagel 40 – 63 μm – *Merck (SRN)*.

4.2 Použité přístroje

Termomixer - *Eppendorf (SRN)*

Spektrofotometr *Sunrise*TM - *Tecan GmbH (SRN)*

Ultracentrifuga *Optima*TM - *Beckman (USA)*

Centrifuga *MiniSpin*[®] - *Eppendorf (SRN)*

Homogenizátor *Ultra-Turrax T8* - *Ika (SRN)*

4.3 Použité metody

4.3.1 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

TLC bylo užito ke sledování průběhu všech reakcí a separací. Mobilní fáze použitá při TLC byla CHCl_3 /aceton/ HCOOH (12:2:1, v/v). Detekce byla prováděna nejprve pod

ultrafialovou lampou (254 nm), a poté postřikem roztokem 5 % H₂SO₄ v ethanolu a následně mineralizací zahřátím.

4.3.2 Preparativní sloupcová chromatografie na silikagelu

Rozměry použité kolony byly voleny vzhledem k množství separované směsi. Průtok mobilní fáze byl urychlen přetlakem vzduchu 0,001-0,002 MPa („flash“ chromatografie), složení mobilní fáze je uvedeno u jednotlivých postupů. Průběh separace byl sledován pomocí TLC. Separovaná směs byla na kolonu nanášena rozpuštěná v mobilní fázi, v případě problému s rozpustností byl ke směsi přidán silikagel a snadno odpařitelné rozpouštědlo, ve kterém se daná směs dobře rozpouštěla (nejčastěji aceton) a po odpaření byla směs adsorbovaná na silikagelu nasypána na sloupec silikagelu v koloně.

4.4 Syntéza derivátů silybinu

4.4.1 Příprava chloridů kyselin

Chlorid kyseliny oktanové a dodekanové byl připraven reakcí příslušné kyseliny s oxalylchloridem postupem popsaným v literatuře.^[53]

4.4.2 Příprava esterů silybinu – metoda A

4.4.2.1 Příprava 23-*O*-palmitoilsilybinu

K roztoku silybinu (1; 750 mg; 0,207 mmol) ve směsi rozpouštědel CH₃CN/CH₂Cl₂ (75 ml, 1:1, v/v) byl přidán chlorid kyseliny palmitové (0,473 ml; 0,207 mmol) a následně BF₃·Et₂O (0,465 ml; 0,496 mmol, 50 % roztok v diethyletheru; v/v). Reakční směs byla míchána 2 h při 0 °C, následně byl přidán další podíl palmitoyl chloridu (0,473 ml; 0,207 mmol) a BF₃·Et₂O (0,465 ml; 0,496 mmol) a míchání pokračovalo při laboratorní teplotě ještě 1 h. Poté byla reakční směs nalita na nasycený roztok NaHCO₃ (50 ml) s ledem a extrahována ethyl-acetátem (2 × 50 ml). Organická fáze byla promyta nasyceným roztokem NaCl (50 ml), vysušena bezvodým Na₂SO₄ a odpařena na vakuové odparce. Chromatografií na silikagelu (mobilní fáze: chloroform/aceton/kyselina mravenčí - 95:5:1) byl získán čistý 23-*O*-palmitoilsilybin (**14**, (*tabulka 1, str 27*), 228 mg, 20,4 %) jako

nažloutlá amorfni látka. ^1H a ^{13}C NMR data byla ve shodě s dříve uvedenými.^[54] ESI MS (m/z): 721,2 $[\text{M} + \text{H}]^+$. Vypočtené (m/z) látky **14** je 721,36 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

Další 23-*O*-acyl deriváty silybinu byly připraveny analogickým způsobem, bližší údaje jsou uvedeny v *tabulce 1*.

4.4.3 Příprava esterů silybinu – metoda B

4.4.3.1 Příprava 7-*O*-palmitoysilybinu

K roztoku silybinu (**1**; 750 mg; 0,207 mmol) v pyridinu (40 ml) byl přidán chlorid kyseliny palmitové (0,713 ml; 0,311 mmol) a reakční směs byla míchána 1 h při 0 °C. Reakce byla ukončena nalitím reakční směsi do zředěné kyseliny chlorovodíkové (100 ml, 5 % v/v) chlazené externě ledem a vzniklá směs byla extrahována ethyl-acetátem. Organická fáze byla promyta nejprve nasyceným roztokem NaHCO_3 a poté nasyceným roztokem NaCl , vysušena bezvodým Na_2SO_4 a odpařena na vakuové odparce. Chromatografií na silikagelu s mobilní fází chloroform/aceton/kyselina mravenčí (95:5:1) byl získán čistý 7-*O*-palmitoysilybin (**15** (*tabulka 1*), 330 mg, 29,5 %).

^1H a ^{13}C NMR data byla ve shodě s dříve uvedenými.^[54] MALDI MS (m/z): 743,3 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Vypočtené m/z látky **15** je 743,34 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

Ostatní 7-*O*-acyl deriváty silybinu byly připraveny analogickým způsobem, bližší údaje jsou uvedeny v *tabulce 1*.

Tabulka 1: Příprava esterů silybinu

| chlorid kyseliny | metoda | produkt* | výtěžek [%] |
|-------------------|--------|---|-------------|
| butanoylchlorid | B | 7- <i>O</i> -butanoylsilybin (16) | 44,5 |
| oktanoylchlorid | B | 7- <i>O</i> -oktanoylsilybin (18) | 19,0 |
| dodekanoylchlorid | B | 7- <i>O</i> -dodekanoylsilybin (19) | 17,4 |
| palmitoylchlorid | B | 7- <i>O</i> -palmitoysilybin (15) | 29,5 |
| butanoylchlorid | A | 23- <i>O</i> -butanoylsilybin (20) | 22,5 |
| oktanoylchlorid | A | 23- <i>O</i> -oktanoylsilybin (21) | 23,8 |
| dodekanoylchlorid | A | 23- <i>O</i> -dodekanoylsilybin (22) | 14,5 |
| palmitoylchlorid | A | 23- <i>O</i> -palmitoysilybin (14) | 20,4 |

* - analytická data (NMR) byla pro všechny připravené deriváty ve shodě s dříve publikovanými.^[56]

4.5 Stanovení antioxidační aktivity esterů silybinu

4.5.1 Zhášení *N,N*-difenyl-*N'*-pikrylhydrazylového radikálu (DPPH test)

Zásobní roztoky látek **14 - 22** (a silybinu jako referenční látky (*tabulka 1, str 27*), o koncentraci $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) byly připraveny jejich rozpuštěním ve směsi DMSO/methanol (1:9, v/v). Dále byl připraven roztok DPPH radikálu o koncentraci $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Jako slepý vzorek byl použit roztok DMSO/methanol v poměru 1:9. Pro stanovení bylo do jamek mikrotitrační destičky napipetováno $65 \mu\text{l}$ methanolového roztoku testované látky o koncentracích 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; $0,3125 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a poté bylo do všech jamek aplikováno $65 \mu\text{l}$ připraveného roztoku DPPH. Po 10 min byla měřena absorbance při 540 nm.

4.5.2 Inhibice lipoperoxidace

4.5.2.1 Izolace mikrosomální frakce potkaních jater

Mikrosomální frakce byla izolována z jater laboratorních potkanů postupem popsaným v literatuře.^[55,56] Jaterní tkáň byla rozmělněna a homogenizována v ledovém pufru 1 (Tris/HCl (3 mmol/l), sacharosa (250 mmol/l) a EDTA (0,1 mmol/l), pH 7,4). Získaný 20 % (w/w) homogenát byl centrifugován (15 min/800 g/4 °C) pro odstranění zbytků krvinek a pojivové tkáně. Poté následovala centrifugace supernatantu (20 min/8000 g/4 °C). Vzniklý supernatant s mikrosomální frakcí byl převeden do ultracentrifugačních zkumavek a ultracentrifugován (1 h/105000 g/4°C). Sediment vzniklý ultracentrifugací byl resuspendován v pufru 2 (Tris/HCl (50 mmol/l) s KCl (100 mmol/l) a EDTA (1 mmol/l), pH 7,4), poté byl znovu centrifugován (1 h/ 105000 g/4 °C) a resuspendován ve vodném roztoku KCl (0,5 ml; 1,15 %) a nakonec byl ředěn pufrům 3 (Tris/HCl (50 mmol/l) s EDTA (0,1 mmol/l), pH 7,6). V získané suspenzi byly stanoveny proteiny metodou podle Bradfordové.^[57] Takto získaná mikrosomální frakce byla před dalším použitím uchovávána při $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.5.2.2 Inhibice lipoperoxidace mikrosomálních membrán

Směs 400 μ l mikrosomální suspenze (o výsledné koncentraci 0,625 mg/ml) a 50 μ l testovaných látek v DMSO o výsledných koncentracích (0-100 μ M) byla inkubována v 1,5 ml mikrozkuřavkách v termomixeru 1 h při 37 °C. Peroxidace membránových lipidů byla indukována 50 μ l *tert*-butylhydroperoxidu (*t*BH) o výsledné koncentraci 1 mmol/l; celkový objem reakční směsi činil 0,5 ml. Slepá zkouška obsahovala pouze použitý pufr 3 (Tris/HCl (50 mmol/l) s EDTA (0,1 mmol/l), pH 7,6), tedy bez přídavku *tert*-butylhydroperoxidu (*t*BH). Po inkubaci bylo k reakční směsi přidáno 0,7 ml ledové směsi kyseliny thiobarbiturové a trichloroctové (TBA – TCA; připraveno předem smícháním TBA 26 mmol/l, TCA 918 mmol/l s destilovanou vodou za tepla) a vzorky dále zahřívány 15 min při 90 °C. Po ochlazení a centrifugaci (10 min./900 g) bylo z každého vzorku odebráno 200 μ l a přeneseno do jamky 96 jamkové mikrotitrační destičky. Byla změřena absorbance při 535 nm a stanovena hodnota IC₅₀ ze získaného souboru dat pro měřenou látku.

5 VÝSLEDKY

5.1 Redukce *N,N*-difenyl-*N'*-pikrylhydrazylového radikálu

Metoda zhášení (redukce) DPPH radikálu byla použita ke srovnání antiradikálové aktivity nových derivátů silybinu. Výsledky stanovení (*tabulka 2*) jsou vyjádřeny jako koncentrace testovaných látek, které způsobily 50 % pokles absorbance roztoku DPPH při vlnové délce 540 nm.

Tabulka 2: Antiradikálová aktivita derivátů silybinu vůči DPPH

| Testovaná látka | IC ₅₀ (mmol/l) |
|--------------------------------------|---------------------------|
| silybin (1) | 2,1 |
| 7- <i>O</i> -butanoylsilybin (16) | 2,3 |
| 7- <i>O</i> -oktanoylsilybin (18) | 4,0 |
| 7- <i>O</i> -dodekanoylsilybin (19) | 3,0 |
| 7- <i>O</i> -palmitoylsilybin (15) | 3,6 |
| 23- <i>O</i> -butanoylsilybin (20) | 3,9 |
| 23- <i>O</i> -oktanoylsilybin (21) | 3,9 |
| 23- <i>O</i> -dodekanoylsilybin (22) | 3,9 |
| 23- <i>O</i> -palmitoylsilybin (14) | 4,8 |

IC₅₀ - koncentrace měřené látky způsobující 50 %-ní pokles absorbance roztoku DPPH

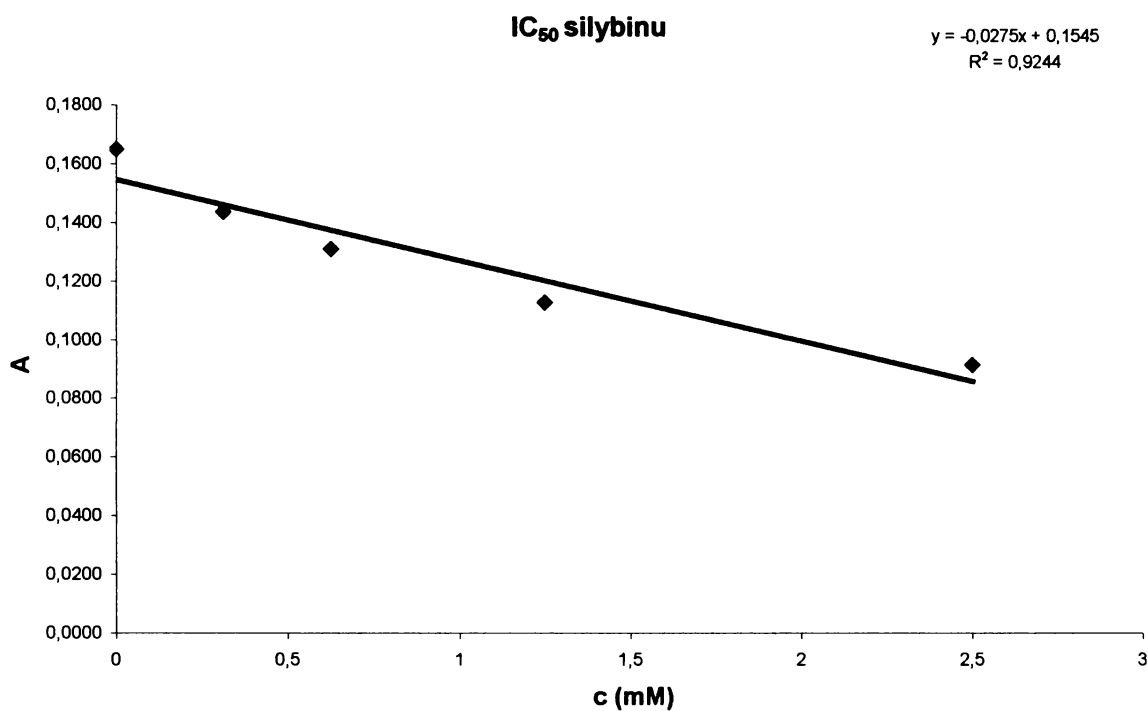
Esterikace silybinu mastnými kyselinami vedla ve všech případech ke snížení jeho antiradikálové aktivity vůči DPPH-radikálu, přičemž acylace skupiny 23-OH byla ve většině případů spojena s podstatnějším snížením antiradikálové aktivity než acylace skupiny 7-OH, což naznačuje, že skupina 7-OH silybinu je schopna interagovat s DPPH radikálem.

5.1.1 Vyhodnocení DPPH testu

Na příkladu silybinu je ukázán postup, podle kterého byly zpracovány veškeré výsledky měření ostatních derivátů silybinu (uvedené v *tabulce 2*). Zjištěné hodnoty pro silybin (*tabulka 3, str. 31*) byly vyneseny do *grafu 1 (str.31)*. Ze získané rovnice regrese byla vypočtena IC₅₀, tedy koncentrace odpovídající polovině absorbance A₀ (A₀ – absorbance roztoku DPPH bez přídavku antioxidantu).

Tabulka 3: Absorbance roztoku DPPH v závislosti na koncentraci silybinu

| koncentrace silybinu (mM) | absorbance | | | průměrná absorbance |
|---------------------------|------------|-------|-------|---------------------|
| 20 | 0,061 | 0,064 | 0,062 | 0,0623 |
| 10 | 0,058 | 0,062 | 0,061 | 0,0603 |
| 5 | 0,065 | 0,069 | 0,071 | 0,0683 |
| 2,5 | 0,086 | 0,094 | 0,094 | 0,0913 |
| 1,25 | 0,107 | 0,117 | 0,114 | 0,1127 |
| 0,625 | 0,124 | 0,132 | 0,137 | 0,1310 |
| 0,3125 | 0,139 | 0,148 | 0,144 | 0,1437 |
| 0 | 0,161 | 0,168 | 0,166 | 0,1650 |



Graf 1: Graf závislosti absorbance při 540 nm na koncentraci silybinu

5.2 Inhibice lipoperoxidace

Antioxidační účinek testovaných derivátů silybinu byl ověřen na modelu inhibice lipoperoxidačního poškození jaterních subcelulárních membrán (mikrosomů).

Lipoperoxidace mikrosomálních membrán byla indukována *terc*-butylhydroperoxidem (o výsledné koncentraci 1 mmol/l) a následně byla sledována její inhibice testovanými deriváty silybinu v koncentračním rozmezí 20-100 μ mol/l.

Výsledky měření jsou shrnuty v *tabulce 4* (str. 32) a je z nich patrné, že schopnost derivátů silybinu inhibovat lipoperoxidaci mikrosomálních membrán klesá v pořadí:

7-*O*-palmitoysilybin (15) > 7-*O*-dodekanoylsilybin (19) > 23-*O*-palmitoysilybin (14) > 23-*O*-dodekanoylsilybin (22) > silybin (1) > 23-*O*-oktanoylsilybin (21) > 7-*O*-butanoylsilybin (16) > 7-*O*-oktanoylsilybin (18) > 23-*O*-butanoylsilybin (20)

Z těchto výsledků je možno vyvozovat, že esterifikace silybinu karboxylovou kyselinou s delším řetězcem (C-12 a C-16) vede k derivátu s vyšší antilipoperoxidační aktivitou (ve srovnání se silybinem), zatímco esterifikace silybinu karboxylovými kyselinami s kratšími řetězci (C-4 a C-8) tuto aktivitu snižuje. Kromě toho je patrné, že esterifikace 7-OH silybinu vede k derivátům s vyšší aktivitou než esterikace 23-OH. Nejvyšší anti-lipoperoxidační aktivitu z připravených derivátů vykazoval 7-*O*-palmitoysilybin (15), který měl více než dvakrát vyšší aktivitu než nemodifikovaný silybin.

Tabulka 4: Inhibice lipoperoxidace mikrosomálních membrán deriváty silybinu

| Testovaná látka | IC ₅₀ (μ mol/l) |
|--------------------------------------|---------------------------------|
| silybin (1) | 71 |
| 7- <i>O</i> -butanoylsilybin (16) | 93 |
| 7- <i>O</i> -oktanoylsilybin (18) | 119 |
| 7- <i>O</i> -dodekanoylsilybin (19) | 60 |
| 7- <i>O</i> -palmitoysilybin (15) | 31 |
| 23- <i>O</i> -butanoylsilybin (20) | 123 |
| 23- <i>O</i> -oktanoylsilybin (21) | 77 |
| 23- <i>O</i> -dodekanoylsilybin (22) | 67 |
| 23- <i>O</i> -palmitoysilybin (14) | 62 |

6 Diskuze

V posledních 5 letech bylo publikováno více než 400 prací zabývajících se silybinem, silymarinem a jejich medicínským využitím, což prokazuje značný význam těchto látek ve farmakologii.^[1] Biologická dostupnost silybinu je však poměrně limitována jeho nízkou rozpustností ve vodě. Bylo zjištěno, že modifikace silybinu s cílem zvýšit jeho hydrofilitu, vedou spíše ke zhoršení jeho biologické aktivity.^[15-17] Pravděpodobným vysvětlením této skutečnosti je fakt, že silybin působí hlavně v lipofilních kompartmentech buněk (např. lipidová dvojvrstva cytoplazmatické membrány).^[3] Jinou cestou, jak zvýšit biologickou dostupnost silybinu, aniž by však byla snížena jeho biologická aktivita, je tvorba nekovalentního komplexu silybinu s fosfatidylcholinem.^[19]

Selektivní acylace vhodné polohy (případně poloh) silybinu vyšší mastnou kyselinou představuje další možnost, jak připravit lipofilní derivát silybinu se zachovanou (popř. i zvýšenou) biologickou aktivitou. Strukturně aktivní studie různých derivátů silybinu naznačují, že pro substituci je z hlediska zachování nebo dokonce potenciace antiradikálové aktivity nejvýhodnější poloha 7-OH, popř. poloha 23-OH.^[42]

Aby bylo možno ověřit tyto úvahy a prokázat správnost této strategie, byla připravena série esterů silybinu (v polohách 7-OH a 23-OH) s karboxylovými kyselinami o různé délce řetězce. Antioxidační (antiradikálová) aktivita těchto derivátů byla sledována pomocí dvou metod: a) tzv. DPPH-test, který vyjadřuje schopnost daného derivátu redukovat stabilní DPPH radikál; b) inhibice lipoperoxidace mikrosomálních membrán indukované *tert*-butylhydroperoxidem. Na základě získaných výsledků byl také vyhodnocen vliv délky řetězce karboxylové kyseliny a polohy substituce silybinu na antioxidační aktivitu.

Esterikace silybinu mastnými kyselinami vedla ve všech případech ke snížení jeho antiradikálové aktivity vůči DPPH-radikálu, přičemž acylace skupiny 23-OH byla ve většině případů spojena s podstatnějším snížením antiradikálové aktivity než acylace skupiny 7-OH. Tento závěr je v souladu s dřívějšími poznatky, naznačujícími pro-oxidační aktivitu polohy 7-OH molekuly silybinu.^[58] Substituce skupiny 7-OH snižuje aktivitu silybinu vůči DPPH, protože tato skupina je schopna interagovat s DPPH radikálem. Poněkud překvapující je však skutečnost, že substituce polohy 23-OH silybinu vede také ke snížení jeho schopnosti redukovat DPPH radikál neboť tato funkční skupina molekuly

silybinu neinteraguje s radikály (tedy ani s DPPH). Možným vysvětlením tohoto chování 23-*O*-acyl derivátů silybinu může být skutečnost, že amfifilní látky na bázi mastných kyselin tvoří v polárních rozpouštědlech nadmolekulární struktury (micely). Existence takovýchto nadmolekulárních útvarů pak může vést ke stérickému bránění interakce volného radikálu (DPPH) s polohou zodpovědnou za antiradikálovou aktivitu silybinu (poloha 20-OH). Správnost těchto úvah podporuje také fakt, že u esterů s kratším uhlovodíkovým řetězcem je snížení jejich antiradikálové aktivity méně výrazné než u esterů s řetězcem delším (butyrát *versus* palmitát), neboť zřejmě s délkou řetězce mastné kyseliny roste také amfifilní charakter molekuly, což vede ke tvorbě stabilnějších nadmolekulárních útvarů a efektivnějšímu bránění přístupu volného radikálu k antiradikálově působícím skupinám esteru.

Pro detailnější ověření antioxidační aktivity byly připravené deriváty testovány na jejich schopnost inhibovat lipoperoxidaci mikrosomální membrány potkaního hepatocytu. Hodnoty IC₅₀ derivátů silybinu se pohybovali v rozmezí 31– 123 μmol/l, přičemž IC₅₀ nemodifikovaného silybinu byla 71 μmol/l. Na základě získaných výsledků bylo zjištěno, že délka řetězce karboxylové kyseliny hraje významnou roli v antilipoperoxidační aktivitě esterů silybinu, neboť esterifikace silybinu karboxylovou kyselinou s delším řetězcem (C-12 a C-16) vedla k derivátu s vyšší antilipoperoxidační aktivitou (ve srovnání se silybinem), zatímco esterifikace kyselinami s kratšími řetězci (C-4 a C-8) tuto aktivitu snižovala. Bylo také zjištěno, že esterifikace 7-OH silybinu vede k derivátům s vyšší aktivitou než esterifikace 23-OH.

7 Závěr

V rámci této práce byla připravena série esterů silybinu (v polohách 7-OH a 23-OH) s karboxylovými kyselinami s různou délkou řetězce (butyrát, oktanoát, dodekanoát a palmitát) a byla sledována jejich antioxidační aktivita na základě jejich schopnosti redukovat stabilní DPPH radikál a inhibovat lipoperoxidaci mikrosomálních membrán.

Esterifikace silybinu vedla k derivátům s nižší antiradikálovou aktivitou vůči DPPH radikálu, přičemž esterifikace polohy 23-OH silybinu vedla k výraznějšímu snížení této aktivity než esterifikace polohy 7-OH molekuly silybinu.

Na schopnosti esterů silybinu inhibovat *tert*-butylhydroperoxidem indukovanou lipoperoxidaci mikrosomálních membrán bylo dále zjištěno, že esterifikace polohy 7-OH silybinu karboxylovými kyselinami s delším řetězcem (C-12 a C-16) vede ke zvýšení jeho inhibiční aktivity, zatímco esterifikace kyselinami s kratším řetězcem (C-4 a C-8) inhibiční aktivitu snižuje. Vliv esterifikace polohy 23-OH silybinu měl podobný trend, avšak nebyl tak výrazný jako v případě 7-*O*-acyl derivátů. Z toho vyplývá, že poloha 23-OH silybinu je méně vhodná pro esterifikaci silybinu s cílem získat deriváty s vyšší antioxidační aktivitou.

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Gažák, R., Walterová, D., Křen, V.: Silybin and silymarin – new and emerging applications in medicine. *Curr. Med. Chem.* **14**, 315-338 (2007).
2. Morazzoni, P., Bombardelli, E.: *Silybum marianum* (*Cardus marianus*). *Fitoterapia* **66**, 3-42 (1995).
3. Wesolowska, O., Łania-Pietrzak, B., Kuzdzal, M., Stanczak, K., Mosiadz, D., Dobryczycki, P., Ozyhar, A., Komorowska, M., Hendrich, A. B., Michalak, K.: Influence of silybin on biophysical properties of phospholipid bilayers. *Acta Pharmacol. Sin.* **28**, 296–306 (2007).
4. Kim, N. Ch., Graf, T. N., Sparacino, Ch. M., Wani, M. C., Wall, M. E.: Complete isolation and characterization of silybins and isosilybins from milk thistle (*Silybum marianum*). *Org. Biomol. Chem.* **1**, 1684-1689 (2003).
5. Wagner, H., Hörhammer, L., Münster R.: Zur chemie des silymarins (Silybin), des wirkprinzips der fruchte von *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (*Cardus marianus* L.). *Arzneim.-Forsch.* **18**, 688-695 (1968).
6. Wagner, H., Hörhammer, L., Seitz, M.: Chemical evaluation of a silymarin-containing flavonoid concentrate from *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *Arzneim.-Forsch.* **18**, 696-698 (1968).
7. Lee, D. Y.-W., Liu, Y.: Molecular structure and stereochemistry of silybin A, silybin B, isosilybin A, and isosilybin B, isolated from *Silybum marianum* (Milk Thistle). *J. Nat. Prod.* **66**, 1171-1174 (2003).
8. Freudenberg, K., Neish, A. C.: Constitution and biosynthesis of lignin, str. 82. Springer Verlag, Berlin (1968).
9. Pelter, A., Hänsel, R.: The structure of silybin (silybum substance E₆), the first flavonolignan. *Tetrahedron Lett.* **25**, 2911-2916 (1968).
10. Schroll, R., Becker, H.: Callus- und suspensionskulturen von *Silybum marianum*. *Planta Med.* **32**, 27-32 (1977).
11. Arnone, A., Merlini, L., Zanarotti, A.: Constituents of *Silybum marianum*. Structure of isosilybin and stereochemistry of silybin. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 696-697 (1979).

12. Tanaka, H., Shibata, M., Ohira, K., Ito, K.: Total synthesis of (+/-)-silybin, an antihepatotoxic flavonolignan. *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 1419-1423 (1985).
13. Markham, K. R.: Techniques of flavonoid identification, str. 2. Academic Press, New York (1982).
14. Goodwin, T. W., Mercer, E. I.: Introduction to plant biochemistry, str. 81. Pergamon Press, London (1983).
15. Braatz, R., Gurler, K., Bergish, G., Halbach, G., Soicke, H., Schmidt, K.: Czech. Pat., 1985, 273610, (Chem. Abstr., 1985, *105*, P127476b).
16. Pifferi, G., Pace, R., Conti, M.: Synthesis and antihepatotoxic activity of silybin 11-O-phosphate. *Il Farmaco* **49**, 75-76 (1994).
17. Křen, V., Kubisch, J., Sedmera, P., Halada, P., Přikrylová, V., Jegorov, A., Cvak, L., Gebhardt, R., Ulrichová, J., Šimánek, V.: Glycosylation of silybin. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2467-2474 (1997).
18. Gažák, R., Svobodová, A., Psotová, J., Sedmera, P., Přikrylová, V., Walterová, D., Křen, V.: Oxidised derivatives of silybin and their antiradical and antioxidant activity. *Bioorg. Med. Chem.* **12**, 5677-5687 (2004).
19. Buzzelli, G., Moscarella, S., Gusti, A., Duchini, A., Marena, C., Lampertico, M.: A pilot study on the liver protective effect of silybin-phosphatidylcholine complex (IdB1016) in chronic active hepatitis. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* **31**, 456-460 (1993).
20. Blumenthal, M., Busse, W.: The complete german commission E monographs: Therapeutic to herbal medicines. American botanical council and integrative medicine communications, str. 685-698, Austin, TX (1998).
21. Wieland, T.: Struktur und wirkung der amatoxine. *Naturwissenschaften* **59**, 225-231 (1972).
22. Wieland, T., Faulstich, H.: Amatoxins, phallotoxins, phallolysin, and antamanide: The biologically active components of poisonous *Amanita* mushrooms. *C.R.C. Crit. Rev. Biochem.*, 185-260 (1978).
23. Vogel, G., Tuchweber, B., Trost, W., Mengs, U.: Protection by silibinin against *Amanita phalloides* intoxication in beagles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **73**, 355-62 (1984).

24. Hahn, G., Lehmann, H. D., Kürten, M., Uebel, H., Vogel, G.: Zur pharmakologie und toxikologie von silymarin, des antihepatotoxischen wirkprinzips aus *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *Arzneim.-Forsch.* **18**, 698-704 (1968).
25. Schriewer, H., Badde, R., Roth, G., Raven, H. M.: Antihepatotoxic effect of silymarin in thioacetamide- damaged liver. *Arzneim.-Forsch.* **23**, 160-1 (1973).
26. Kropáčová, K., Mišurová, E., Hálková, H.: Protective and therapeutic effect of silymarin on the development of latent liver damage. *Radiats. Biol. Radioecol.* **38**, 411-5 (1998).
27. Pietrangelo, A., Borella, F., Casalgrandi, G.: Antioxidant activity of silybin *in vivo* during long-term iron overload in rats. *Gastroenterology* **109**, 1941-1949 (1995).
28. McPartland, J. M.: Viral hepatitis treated with *Phyllanthus amarus* and milk thistle (*Silybum marianum*): A case report. *Complementary Med. International*, 40-42 (1996).
29. Baer-Dubowska, W., Szaefer, H., Krajka-Kuzniak, V.: Inhibition of murine hepatic cytochrome P450 activities by natural and synthetic phenolic compounds. *Xenobiotica* **28**, 735-743 (1998).
30. Fiebrich, F., Koch, H.: Silymarin, an inhibitor of lipoxygenase. *Experientia* **35**, 1548-1560 (1979).
31. Dorai, T., Aggarwal, B. B.: Role of chemopreventive agents in cancer therapy. *Cancer Lett.* **215**, 129–140 (2004).
32. Vinh, P. Q., Sugie, S., Tanaka, T., Hara, A., Yamada, Y., Katayama, M., Deguchi, T., Mori, H.: Chemopreventive effects of a flavonoid antioxidant silymarin on *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced urinary bladder carcinogenesis in male ICR mice. *Jpn. J. Cancer Res.* **93**, 42–49 (2002).
33. Kohno, H., Tanaka, T., Kawabata, K., Hirose, I., Sugie, S., Tsuda, H., Mori, H.: Silymarin, a naturally occurring polyphenolic antioxidant flavonoid, inhibits azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats. *Int. J. Cancer* **101**, 461–468 (2002).
34. Šimánek, V., Křen, V., Ulrichová, J., Vičar, J., Cvak, L.: Silymarin: What is in the name? *Hepatology* **32**, 442-443 (2000).
35. Jacobs, B. P., Dennehy, C., Ramirez, G., Sapp, J., Lawrence, V. A.: Milk thistle for the treatment of liver disease: A systematic review and meta-analysis. *Am. J. Med.* **113**, 506-515 (2002).

36. Dvořák, Z., Vrzal, R., Ulrichová, J.: Silybin and dehydrosilybin inhibit cytochrome P450 1A1 catalytic activity: A study in human keratinocytes and human hepatoma cells. *Cell. Biol. Toxicol.* **22**, 81-90 (2006).
37. McCay, P. B., Lai, E. K., Poyer, J. L., Dubose, C. M., Janzen, E. G. Oxygen- and carbon-centered free radical formation during carbon tetrachloride metabolism. Observation of lipid radicals *in vivo* and *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **259**, 2135-2143 (1984).
38. Morris, C. J., Earl, J. R., Trenam, C. W., Blake, D. R.: Reactive oxygen species and iron- a dangerous partnership in inflammation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **27**, 109-122 (1995).
39. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C.: *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, Oxford (1998).
40. Hanasaki, Y., Ogawa, S., Fukui, S.: The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biol. Med.* **16**, 845-850 (1994).
41. Ursini, F., Maiorino, M., Morazzoni, P., Roveri, A., Pifferi, G.: A novel antioxidant flavonoid (IdB 1031) affecting molecular mechanisms of cellular activation. *Free Radical Biol. Med.* **16**, 547-553 (1994).
42. Gažák, R.: Disertační práce, str. 48, VŠCHT Praha (2006).
43. Lu, Y., Foo, L. Y.: Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinallis*). *Food Chem.* **75**, 197-202 (2001).
44. Mensor, L. L., Menezes, F. S., Leitao, G. G., Reis, A. S., dos Santos, T. C., Coube, C. S., Leitao, S.C.: Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother. Res.* **15**, 127-30 (2001).
45. Chen, J. H., Ho, C. T.: Antioxidant activities of caffeic acid and related hydroxycinnamic acid compounds. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 2374-8 (2001).
46. Aquino, R., Morelli, S., Lauro, R., Abdo, S., Saija, A., Tomaino, A.: Phenolic constituents and antioxidant activity of an extract of *Anthurium versicolor* leaves. *J. Nat. Prod.* **64**, 1019 (2001).
47. Silva, F. A. M., Borges, F., Guimaraes, C., Lima, J. L., Matos, C., Reis, S.: Phenolic acids and derivatives: studies on the relationship among structure, radical scavenging activity and physicochemical parameters. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 2122 (2000).

48. Frankel, E.N.; Meyer, A.S.: The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J. Sci. Food Agric.* **80**, 1925-1941 (2000).
49. Parasassi, T., Martellucci, A., Conti, F., Messina, B.: Drug-membrane interactions: silymarin, silybin and microsomal membranes. *Cell Biochem. Funct.* **2**, 85-8 (1984).
50. Chalas, J., Claise, C., Edeas, M., Messaoudi, C., Vergnes, L., Abella, A., Lindenbaum, A.: Effect of ethyl esterification of phenolic acids on low-density lipoprotein oxidation. *Biomed. Pharmacother.* **55**, 54-60 (2001).
51. Saija, A., Scalese, M., Lanza, M., Marzullo, D., Bonina, F., Castelli, F.: Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. *Free Radic. Biol. Med.* **19**, 481 (1995).
52. Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G.: Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* **20**, 933 (1996).
53. Pearson, A. J., Roush, W. R.: *Activating Agents and Protecting Groups*, John Wiley and Sons, Chichester (1999).
54. Živná, L.: *Diplomová práce*, VŠCHT Praha (2007).
55. Haraguchi, H., Saito, T., Okamura, N., Yagi, A.: Inhibition of lipid peroxidation and superoxide generation by diterpenoids from *Rosmarinus officinalis*. *Planta Med.* **61**, 333-6 (1995).
56. Mathiesen, L., Malterud, K. E., Sund, R. B.: Antioxidant activity of fruit exudate and C-methylated dihydrochalcones from *Myrica gale*. *Planta Med.* **61**, 515-8 (1995).
57. Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-54 (1976).
58. Gažák, R.; Sedmera, P.; Marzorati, M.; Riva S.; Křen, V.: Laccase-mediated dimerization of the flavonolignan silybin. *J. Mol. Catal. B, Enz.* **50**, 87–92 (2008).

