HABILITAČNÍ PRÁCE

# Biologická aktivita a biotransformace alkaloidů a flavonoidů

Jiří Vrba

Olomouc, 2016

**Poděkování**

Děkuji spoluautorům studií, které jsou součástí této habilitační práce. Děkuji také všem spolupracovníkům z Ústavu lékařské chemie a biochemie LF UP. Zvláště děkuji J. Ulrichové, V. Šimánkovi a M. Modrianskému za rady a připomínky při vzniku této práce.

**Abstrakt**

Biologická aktivita a biotransformace alkaloidů a flavonoidů

Předkládaná habilitační práce pojednává o biologické aktivitě a biotransformaci vybraných rostlinných sekundárních metabolitů a jejich semisyntetických derivátů. Práce obsahuje obecný úvod o farmakologickém významu sekundárních metabolitů, přehled studovaných alkaloidů a flavonoidů a dále komentáře k souboru 15 původních publikací, které jsou uvedeny jako přílohy. Popsaný výzkum byl prováděn na buněčných liniích a primárních buněčných kulturách. Studie se věnují především hledání inhibitorů oxidačního vzplanutí, interakcím s iniciačními transkripčními faktory, jmenovitě s receptorem pro aromatické uhlovodíky (AhR) a jaderným faktorem Nrf2, a také biotransformacím a jejich vlivu na biologickou aktivitu.

**Abstract**

Biological activity and biotransformation of alkaloids and flavonoids

This habilitation thesis presents research on the biological activity and biotransformation of selected plant secondary metabolites and their semisynthetic derivatives. The thesis consists of an introduction about the pharmacological importance of secondary metabolites, overview of tested alkaloids and flavonoids, and comments on the results of 15 original publications which are enclosed in the supplement. The reported research was performed using cell lines and primary cell cultures. The studies focused primarily on the search for inhibitors of the oxidative burst, on the interactions with the initial transcription factors, namely, aryl hydrocarbon receptor (AhR) and nuclear factor Nrf2, and on the biotransformations and their effect on the biological activity.

**Obsah**


| | |
|---|---|
| Seznam zkratek | 9 |
| 1. Úvod: farmakologický význam sekundárních metabolitů | 11 |
| 2. Studované sloučeniny | 13 |
| 3. Použité buněčné modely | 18 |
| 4. Výsledky a diskuse | 19 |
| 4.1. Inhibice oxidačního vzplanutí | 19 |
| 4.2. Aktivace dráhy Keap1–Nrf2 | 21 |
| 4.3. Interakce s dráhou AhR–CYP1A | 23 |
| 4.4. Biotransformace studovaných sloučenin | 25 |
| 4.5. Vliv metabolické transformace na biologickou aktivitu | 27 |
| 5. Závěr a budoucí směřování | 28 |
| 6. Seznam použité literatury | 30 |
| 7. Seznam komentovaných publikací | 34 |
| Přílohy | 36 |

**Seznam zkratek**

| | |
|---|---|
| AhR | receptor pro aromatické uhlovodíky |
| cPKC | konvenční izoformy proteinkinasy C |
| CYP | cytochrom P450 |
| CYP1A1 | cytochrom P450 1A1 |
| ERK | kinasa regulovaná extracelulárními signály |
| fMLP | *N*-formyl-Met-Leu-Phe |
| HO-1 | hemoxygenasa-1 |
| $IC_{50}$ | koncentrace způsobující 50procentní inhibici |
| JNK | c-Jun N-terminální kinasa |
| MAPK | proteinkinasa aktivovaná mitogeny |
| MTT | 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid |
| NADPH | redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát |
| Nrf2 | transkripční faktor *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* |
| HPLC | vysokoúčinná kapalinová chromatografie |
| HPLC/MS | vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí |
| PKC | proteinkinasa C |
| PMA | 12-*O*-myristoylforbol-13-acetát |
| ROS | reaktivní formy kyslíku |
| TCDD | 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin |

## 1. Úvod: farmakologický význam sekundárních metabolitů

Rostlinná říše zahrnuje několik set tisíc druhů organismů, z nichž asi 250 tisíc patří mezi tzv. vyšší rostliny. Rostliny jsou fototrofní organismy, tzn. že jsou schopné přeměňovat světelnou energii slunečního záření na energii chemickou a tu využít pro redukci oxidu uhličitého spojenou s tvorbou glukosy, která je výchozí látkou pro syntézu dalších organických sloučenin. Z chemického složení rostlin vyplývá možnost jejich mnohostranného využití, mj. jako potrava, palivo, stavební materiál, zdroj textilních vláken nebo surovina pro získávání různých látek – barviv, léčiv, povrchově aktivních látek, vonných látek apod. Obecně lze sloučeniny produkované v rostlinách (fytochemikálie) rozdělit na primární a sekundární metabolity. Primární metabolity, např. sacharidy, lipidy, aminokyseliny a nukleotidy, jsou společné pro všechny rostliny a jsou to látky přímo zajišťující základní životní funkce rostlin, tj. jejich vývoj, růst a rozmnožování. Sekundární metabolity jsou pak využívány především pro interakci rostlin s jejich okolím, kdy fungují jako obrana proti parazitům, požíračům či konkurujícím rostlinám, nebo jako signální molekuly pro opylovače a roznašeče semen. Některé sekundární metabolity mohou rostlinu také chránit před ultrafialovým zářením (např. flavonoidy) nebo sloužit pro transport či skladování dusíku (např. alkaloidy, peptidy) [1,2]. Sekundární metabolity se vyskytují ve všech vyšších rostlinách, avšak jejich výskyt je diferencovaný, kdy v daném taxonu obvykle převládá určitá skupina látek. Celkový počet sekundárních metabolitů se odhaduje nejméně na 200 tisíc [3], přičemž zahrnují strukturně rozmanité typy látek, z nichž nejpočetnější jsou alkaloidy, flavonoidy a terpenoidy (tab. 1) [4].

Rostliny, jejich části a výrobky z nich jsou jednou ze základních složek lidské stravy. Primární metabolity obsažené v potravinách zahrnují jak látky, které jsou zdrojem energie (tj. lipidy, sacharidy, bílkoviny), tak další pro člověka nezbytné látky jako vitamíny nebo esenciální aminokyseliny. Nutriční význam sekundárních metabolitů je naopak zanedbatelný. Lidský organismus je zpracovává podobně jako jiná xenobiotika a jejich nedostatek v potravě, na rozdíl např. od vitamínů, nezpůsobuje žádné příznaky [5]. Sekundární metabolity však mohou mít přesto podstatný vliv na lidský organismus, a to pozitivní i negativní. Na jejich prospěšné účinky lidé odedávna spoléhají při využívání léčivých rostlin. V současné době sekundární metabolity, popř. jejich syntetické deriváty, představují přibližně jednu čtvrtinu klinicky používaných léčiv. Jsou také součástí doplňků stravy, které se užívají k prevenci nebo podpůrné léčbě [6]. Z těchto důvodů jsou sekundární metabolity stále předmětem širokého výzkumu zahrnujícího řadu oborů včetně botaniky, chemie a farmakologie.

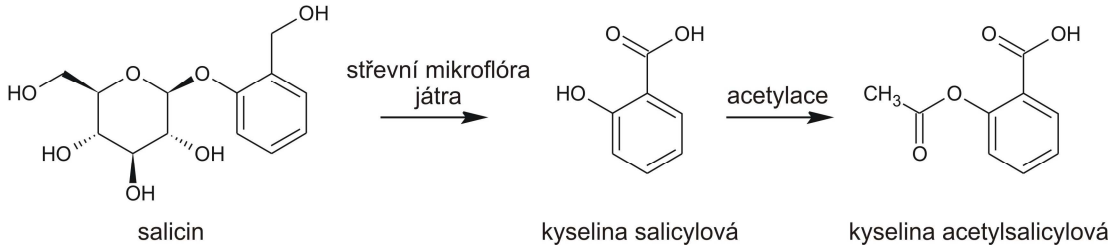
**Tabulka 1.** Odhadované počty známých sekundárních metabolitů rostlin. Upraveno dle [4].

| Typ sekundárních metabolitů | Odhadovaný počet |
|---|---|
| **Dusíkaté metabolity** | |
| alkaloidy | 21000 |
| neproteinogenní aminokyseliny | 700 |
| aminy | 100 |
| kyanogenní glykosidy | 60 |
| glukosinoláty, isothiokyanáty | 100 |
| alkylamidy | 150 |
| peptidy, polypeptidy | 2000 |
| **Bezdusíkaté metabolity** | |
| monoterpeny | 2500 |
| seskviterpeny | 5000 |
| diterpeny | 2500 |
| triterpeny, fytosteroly, saponiny | 5000 |
| tetraterpeny | 500 |
| flavonoidy, tanniny | 8000 |
| fenylpropanoidy, kumariny, lignany | 2000 |
| polyeny, mastné kyseliny, vosky | 1500 |
| polyketidy | 750 |
| sacharidy, karboxylové kyseliny | 400 |

Na základě biologické aktivity lze mezi sekundárními metabolity rozlišit a) sloučeniny se specifickými molekulárními cíli, b) sloučeniny vykazující aktivitu vůči různým molekulárním cílům, c) neaktivní sloučeniny, popř. sloučeniny s dosud neidentifikovanou biologickou aktivitou [3]. Specificky působících látek je mezi sekundárními metabolity jen menšina, přičemž řada z nich se používá jako léčiva. Příkladem rostlinných léčiv používaných v moderní medicíně jsou alkaloidy, např. atropin (anticholinergikum z rulíku zlomocného, *Atropa belladonna*), chinin (antimalarikum z chinovníku lékařského, *Cinchona officinalis*), morfin (narkotické analgetikum z máku setého, *Papaver somniferum*) nebo vinblastin (cytostatikum z barvínku růžového, *Catharanthus roseus*), a terpenoidy, např. artemisinin (antimalarikum z pelyňku ročního, *Artemisia annua*) nebo digitoxin (kardiotonikum z náprstníku červeného, *Digitalis purpurea*). Pleiotropně působící látky, např. flavonoidy, kumariny, terpenoidy či tanniny, se obvykle používají ve formě vícesložkových směsí, jejichž

výsledná bioaktivita může být závislá na potencujícím, aditivním či synergickém účinku jednotlivých složek. Pro terapeutické účely se připravují tekuté extrakty z léčivých rostlin, např. čaje, odvary, tinktury, popř. suché extrakty, které se podávají např. ve formě tablet či kapslí [6]. Příkladem extraktu s významnými farmakologickými účinky je silymarin, což je směs flavonolignanů (silybin, silychristin, silydianin aj.) a dalších látek ze semen ostropestřce mariánského (*Silybum marianum*). Silymarin se používá jako hepatoprotektivum při podpůrné léčbě jaterních poruch způsobených různými hepatotoxickými látkami a virovými infekcemi [7].

Z hlediska farmakologického významu sekundárních metabolitů je třeba zmínit, že některé z nich slouží také jako výchozí surovina nebo jako modelové struktury pro vývoj anebo výrobu syntetických léčiv. Například kyselina acetylsalicylová (antipyretikum a analgetikum), která je celosvětově nejpoužívanější léčivou látkou, je odvozena od kyseliny salicylové, resp. salicinu (obr. 1). Kyselina salicylová je jednak aktivním metabolitem salicinu, hlavní složky extraktu z kůry vrby bílé (*Salix alba*), jednak minoritní složkou zmíněného extraktu, jehož protizánětlivé účinky jsou známy více než 2000 let [8].

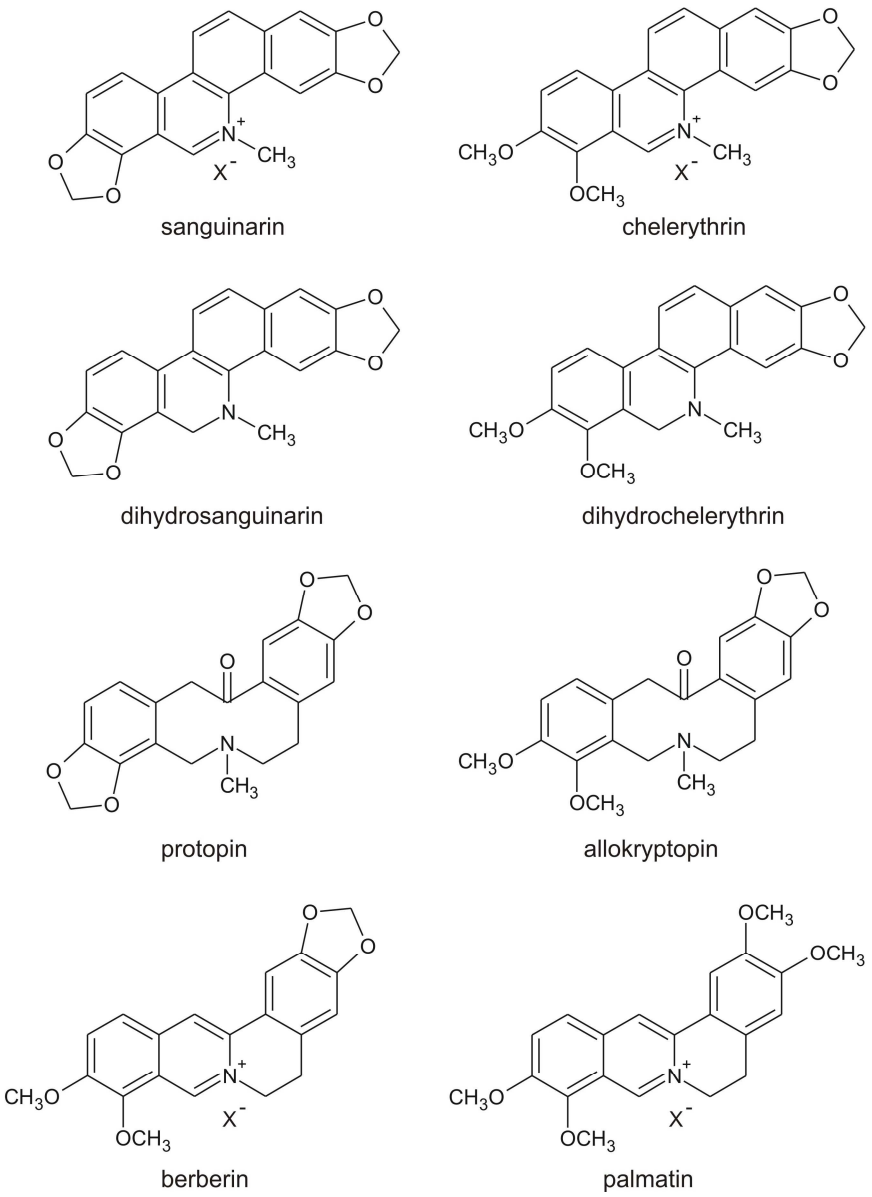



**Obr. 1.** Příklad odvození syntetického léčiva z rostlinného sekundárního metabolitu.

## 2. Studované sloučeniny

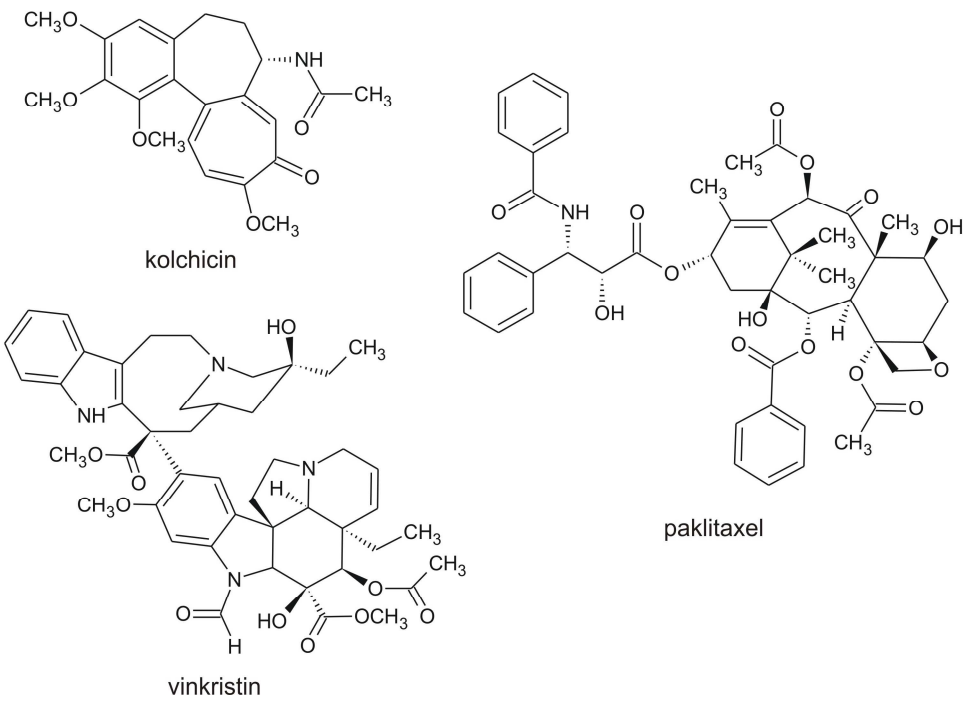
Publikace, jejichž komentáře jsou součástí této habilitační práce, se zabývají *in vitro* biologickou aktivitou alkaloidů a flavonoidů. Alkaloidy jsou sloučeniny obsahující dusík, který je vázaný většinou v heterocyklu, méně často jako aminový dusík v postranním řetězci. Heterocyklické alkaloidy se třídí podle typu dusíkatého heterocyklu např. na alkaloidy pyridinové, indolové, chinolinové a další [6]. Naše práce se zabývají zvláště isochinolinovými alkaloidy, z nichž byly studovány a) benzo[*c*]fenanthridinové alkaloidy sanguinarin, chelerythrin, dihydrosanguinarin a dihydrochelerythrin, b) protopinové alkaloidy protopin a allokryptopin, c) protoberberinové alkaloidy berberin a palmatin (obr. 2). Zdrojem

isochinolinových alkaloidů jsou především různé druhy rostlin z čeledí mákovitých (*Papaveraceae*), zemědýmovitých (*Fumariaceae*), dřišťálovitých (*Berberidaceae*) nebo pryskyřníkovitých (*Ranunculaceae*). Alkaloidy benzofenanthridinového a protopinového typu se vyskytují např. ve vlaštovičníku větším (*Chelidonium majus*), v zemědýmu lékařském (*Fumaria officinalis*), v krevnici kanadské (*Sanguinaria canadensis*), v makleje srdčité (*Macleaya cordata*) a v *Argemone mexicana*. Alkaloidy protoberberinového typu lze nalézt např. v dřišťálu obecném (*Berberis vulgaris*) a koptisu čínském (*Coptis chinensis*). Isochinolinové alkaloidy vykazují širokou biologickou aktivitu, která vyplývá z jejich schopnosti interagovat s proteiny a nukleovými kyselinami. Rostlinné přípravky, které je




**Obr. 2.** Chemické struktury isochinolinových alkaloidů.

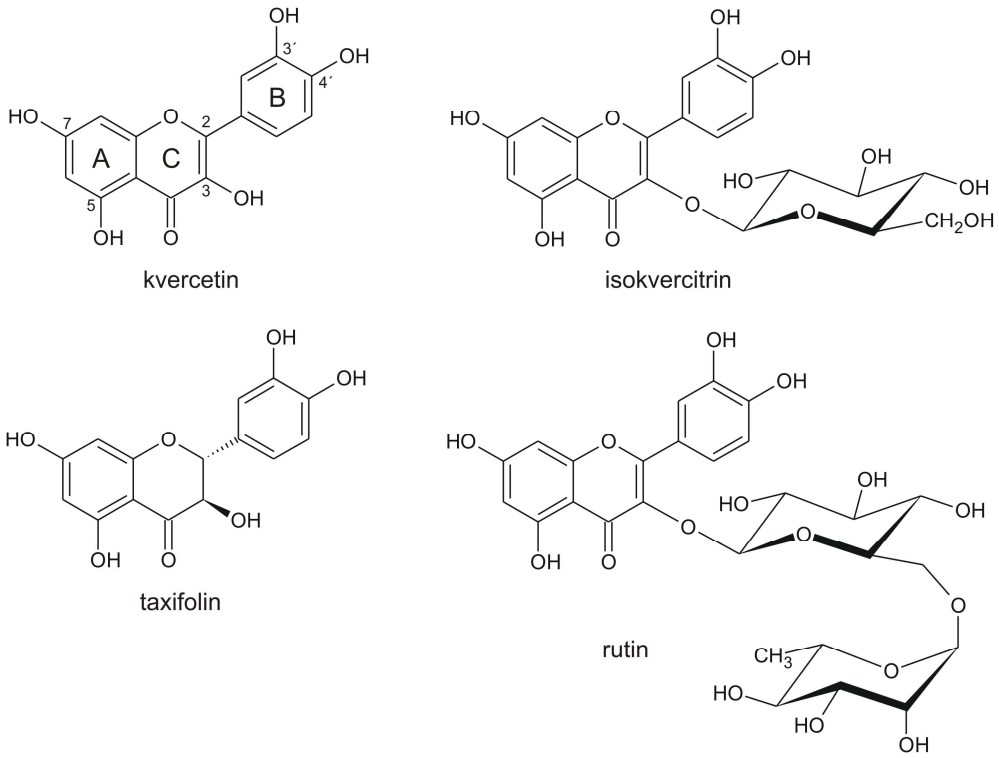
obsahují, se používají hlavně v tradičním asijském lékařství, a to zejména kvůli jejich protizánětlivým a antibakteriálním účinkům. Sanguinarin a chelerythrin jsou také součástí přípravků ústní hygieny a krmných aditiv [9-11]. Okrajově byly studovány také alkaloidy kolchicin, vinkristin a paklitaxel (obr. 3), které narušují vznik nebo zánik mikrotubulů a fungují proto jako inhibitory mitózy (tzv. mitotické jedy). Tropolonový neheterocyklický alkaloid kolchicin, který se vyskytuje v ocúnu jesenním (*Colchicum autumnale*), potlačuje svou vazbou na tubulin vznik mikrotubulů a díky své schopnosti inhibovat pohyblivost neutrofilů se používá při akutních záchvatech dny. Vinkristin z barvínku růžového (*C. roseus*) je také inhibitorem tvorby mikrotubulů, zatímco diterpenový neheterocyklický alkaloid paklitaxel, izolovaný z kůry pacifického tisu (*Taxus brevifolia*), potlačuje naopak jejich zpětný rozklad. Inhibice mitózy těmito alkaloidy je základem jejich cytostatického působení, které se využívá v protinádorové léčbě [12].




**Obr. 3.** Chemické struktury alkaloidů interagujících s mikrotubuly.

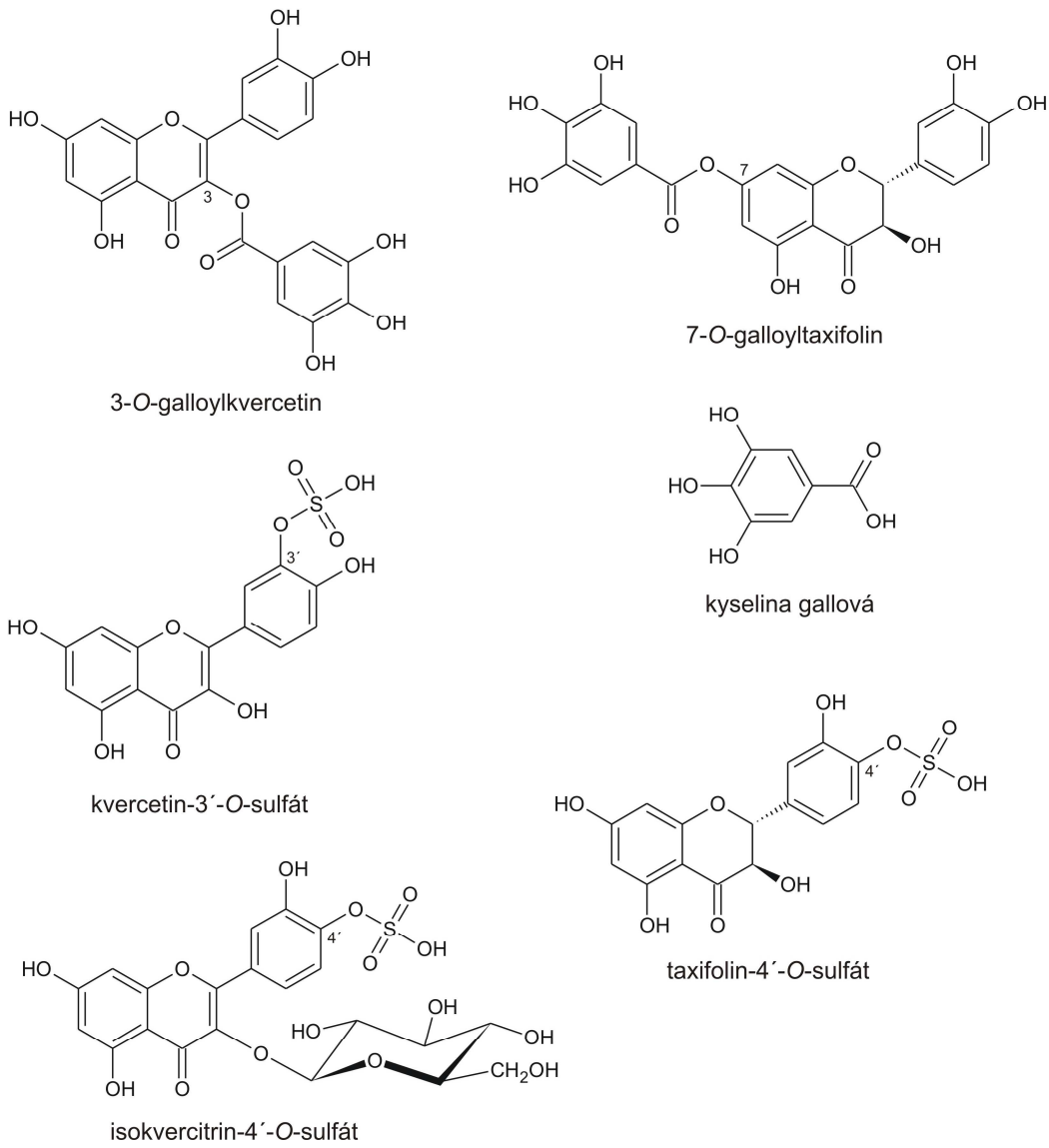
Flavonoidy tvoří nejrozsáhlejší skupinu přírodních fenolových sloučenin, mezi něž se řadí také fenolové kyseliny, hydroxystilbeny, lignany a tanniny. Základní skelet flavonoidů obvykle obsahuje dva aromatické kruhy (A a B) spojené tříuhlíkatým řetězcem, který je součástí kyslíkatého heterocyklu (kruh C). V závislosti na struktuře kyslíkatého heterocyklu se flavonoidy třídí na flavony, flavonoly, flavanoly, flavanony, flavanonoly nebo

anthokyanidiny, přičemž s výjimkou flavanolů se v rostlinách i potravinách často vyskytují ve formě glykosidů [13,14]. Flavonoidy patří mezi intenzivně studované sekundární metabolity, neboť epidemiologické studie prokázaly, že strava bohatá na flavonoidy má příznivý vliv na lidské zdraví. Naše práce zahrnují a) přírodní flavonoidy kvercetin, isokvercitrin (kvercetin-3-*O*-glukosid), rutin (kvercetin-3-*O*-rutinosid) a taxifolin (obr. 4), b) semisyntetické galloylderiváty a sulfáty flavonoidů 3-*O*-galloylkvercetin, 7-*O*-galloyltaxifolin, kvercetin-3'-*O*-sulfát, isokvercitrin-4'-*O*-sulfát a taxifolin-4'-*O*-sulfát (obr. 5). Kvercetin (3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavon), který patří mezi flavonoly, je nejrozšířenějším přírodním flavonoidem. Vyskytuje se prakticky ve všech rostlinách, v ovoci a zelenině, a je tedy běžnou součástí lidské stravy s odhadovaným denním příjmem v průměrné dietě 5–40 mg/den [15]. Nejčastěji se vyskytujícím glykosidem kvercetinu je rutin, jehož vysoký obsah byl zjištěn v pohance (*Fagopyrum* spp.). Rutin je hlavní složka doplňků stravy, u nichž se předpokládá prospěšný vliv při zvýšené lomivosti a propustnosti krevních vlásečnic [16]. Cukernou složku rutinu tvoří rutinosa, tj. disacharid složený z D-glukosy a L-rhamnosy, přičemž enzymovým odštěpením L-rhamnosy lze z rutinu připravit isokvercitrin, který se v rostlinách vyskytuje v mnohem menších množstvích než rutin [17]. Taxifolin (2,3-dihydrokvercetin) nemá na rozdíl od kvercetinu dvojnou vazbu mezi uhlíky C2-C3 a patří mezi flavanonoly. Taxifolin je




**Obr. 4.** Chemické struktury přírodních flavonoidů.

jednou z minoritních složek silymarinu (viz kap. 1) a spolu s kvercetinem a jeho glykosidy, včetně isokvercitrinu a rutinu, se vyskytuje například v cibuli kuchyňské (*Allium cepa*) [18]. V mnoha *in vitro*, *in vivo* i klinických studiích byla pro kvercetin, isokvercitrin, rutin i taxifolin zjištěna dlouhá řada rozmanitých biologických aktivit, které byly shrnuty v přehledných článcích [15-18]. Podle databáze ClinicalTrials.gov jsou kvercetin a isokvercitrin v současné době předmětem dalších klinických studií.




**Obr. 5.** Chemické struktury modifikovaných flavonoidů a kyseliny gallové.

Chemickou modifikací hydroxylových skupin v molekulách přírodních flavonoidů lze získat sloučeniny s jinými fyzikálně-chemickými a biologickými vlastnostmi. Galloylované deriváty kvercetinu a taxifolinu byly připraveny s cílem ověřit možné zesílení biologických

účinků vlivem galloylace, které je známé u přírodních esterů kyseliny gallové s katechiny (flavanoly) [19]. Galloylestery obou flavonoidů byly získány chemickou syntézou, přičemž 7-*O*-galloyltaxifolin byl připraven přímou galloylací taxifolinu, zatímco výchozí látkou pro syntézu 3-*O*-galloylkvercetinu byl glykosid rutin [20] (příloha 11). Důvodem pro přípravu sulfátů bylo studium vlivu sulfatace, která je jednou z konjugačních reakcí uplatňovaných při biotransformaci fenolových sloučenin, na biologickou aktivitu flavonoidů. Sulfatované flavonoidy byly získány syntézou s využitím arylsulfátsulfotransferasy z bakterie *Desulfitobacterium hafniense*. Tento enzym katalyzoval sulfataci použitých flavonoidů specificky na kruhu B, přičemž byly připraveny kvercetin-3'-*O*-sulfát (s určitým podílem dalšího polohového izomeru, tj. kvercetin-4'-*O*-sulfátu), isokvercitrin-4'-*O*-sulfát a taxifolin-4'-*O*-sulfát [21] (příloha 15).

## 3. Použité buněčné modely

Pro jednotlivé studie byly vybrány na základě exprese enzymů či složek signálních drah vhodné buněčné modely a v experimentech tak byly používány jednak komerčně dostupné buněčné linie (HL-60, RAW264.7, HepG2), jednak primární buněčné kultury (potkaní a lidské hepatocyty).

Leukemická buněčná linie HL-60 je odvozena z leukocytů pacientky trpící akutní myeloblastickou leukemií [22]. Buňky HL-60 rostou v suspenzi, mají schopnost spojitě proliferovat a jsou používány při studiu cytotoxicity [23]. Přídavkem některých látek do kultivačního média lze vyvolat diferenciaci buněk HL-60 na neutrofilní nebo eozinofilní granulocyty, monocyty nebo buňky podobné makrofágům [22]. Ve studiích zaměřených na oxidační vzplanutí jsme použili buňky HL-60 diferencované na neutrofily přídavkem dimethylsulfoxidu. Takto diferencované buňky exprimují chemoatraktantové receptory, mají neporušené mechanismy reagující na jejich aktivaci a také všechny složky potřebné pro sestavení funkční NADPH-oxidasy [24].

Makrofágová linie RAW264.7 je odvozena z myších makrofágů transformovaných Abelsonovým virem leukemie [25]. Buňky RAW264.7 se používají např. při studiu mechanismů protizánětlivého působení endogenních a exogenních látek [26] a my jsme je použili při hledání induktorů hemoxygenasy-1.

Hepatomová linie HepG2 je odvozena z buněk izolovaných ze vzorku jaterní tkáně pacienta s hepatocelulárním karcinomem. Buňky HepG2 vykazují ve srovnání s normálními hepatocyty nižší expresi enzymů metabolizujících xenobiotika [27], avšak mají funkční

receptor pro aromatické uhlovodíky a jsou vhodné pro studium exprese cytochromu P450 1A1 [28]. Primární kultury potkaních a lidských hepatocytů jsou naopak metabolicky plně funkční a představují tak optimální buněčný model pro studie zaměřené na metabolismus xenobiotik nebo expresi enzymů metabolizujících xenobiotika [27]. Odběr tkání a použití potkaních a lidských hepatocytů v našich studiích bylo schváleno Odbornou komisí na ochranu zvířat proti týrání, popř. Etickou komisí FN a LF UP Olomouc.

## 4. Výsledky a diskuse

Současný výzkum biologické aktivity sekundárních metabolitů se zaměřuje mimo jiné na jejich možné protektivní působení při vzniku nebo rozvoji nemocí spojených s oxidačním stresem, jako jsou chronické záněty, rakovina [29] nebo kardiovaskulární [30] a neurodegenerativní choroby [31]. Oxidační stres je výsledkem nerovnováhy mezi tvorbou volných radikálů a jiných reaktivních metabolitů, označovaných jako reaktivní formy kyslíku (ROS), a jejich eliminací prostřednictvím enzymových a neenzymových antioxidantů. ROS, které zahrnují např. superoxidový radikál ($^{\bullet}O_2^{-}$), peroxid vodíku ($H_2O_2$), hydroxylový radikál ($^{\bullet}OH$) nebo oxid dusnatý ($NO^{\bullet}$), jsou běžným produktem buněčného metabolismu. Například během mitochondriální produkce ATP je 1–5 % celkového množství spotřebovaného kyslíku přeměněno na superoxidový radikál. Molekuly ROS uplatňují svoji reaktivitu nespecificky vůči okolním molekulám a při své zvýšené produkci se tak mohou zapojit nejen do obranných procesů, např. destrukce fagocytovaného materiálu, ale zároveň mohou poškodit vlastní buňky a celý organismus. Negativní účinky ROS se v buňkách projevují buď přímým poškozením buněčných struktur jako následek nežádoucích modifikací DNA, proteinů či lipidů anebo změnami vyplývajícími z deregulace signálních drah [32]. Do obrany před účinky ROS se mohou kromě endogenních antioxidantů zapojit také látky exogenní, včetně absorbovaných sekundárních metabolitů. Exogenní antioxidanty mohou působit různými mechanismy, a to přímou reakcí s ROS, chelatací iontů přechodných kovů, inhibicí enzymů produkujících ROS nebo ovlivněním exprese antioxidačních enzymů [33].

### 4.1. Inhibice oxidačního vzplanutí (přílohy 1, 3 a 4)

Oxidační neboli respirační vzplanutí je metabolický děj, při němž fagocytující buňky (neutrofilní granulocyty, makrofágy aj.) spotřebovávají molekulární kyslík na tvorbu superoxidového radikálu prostřednictvím transmembránového multikomponentového enzymu

nazývaného fagocytová NADPH-oxidasa ($2\ O_2 + NADPH \rightarrow 2\ {}^{\bullet}O_2^{-} + NADP^{+} + H^{+}$). Fagocytová NADPH-oxidasa patří spolu s induktivní NO-synthasou mezi hlavní zdroje ROS během zánětlivé reakce. K aktivaci NADPH-oxidasy dochází při fagocytóze, kdy stimulace buněčných receptorů specifickými ligandy aktivuje signální dráhy vedoucí k fosforylaci cytosolových podjednotek NADPH-oxidasy a k jejich asociaci s membránovou, katalytickou částí enzymu za vzniku aktivního enzymového komplexu [34].

V práci [35] (příloha 1) jsme studovali mechanismus inhibice oxidačního vzplanutí kvartérním benzo[*c*]fenanthridinovým alkaloidem sanguinarinem, který byl dříve popsán jako inhibitor fagocytárních funkcí lidských neutrofilů [36]. Jako buněčný model byly pro studii zvoleny lidské leukemické buňky HL-60 diferencované vlivem dimethylsulfoxidu na buňky podobné neutrofilům a tvorba superoxidu byla sledována chemiluminiscenční metodou. Výsledky ukázaly, že sanguinarin při mikromolárních koncentracích ($IC_{50}$ 1,5 μM) a krátké inkubační době (5 min.) inhibuje oxidační vzplanutí vyvolané chemotaktickým peptidem *N*-formyl-Met-Leu-Phe (fMLP), který vazbou na receptory pro formylované peptidy spouští celou signální dráhu vedoucí k aktivaci NADPH-oxidasy. S podobnou účinností ($IC_{50}$ 1,8 μM) sanguinarin potlačoval také vzplanutí vyvolané 12-*O*-myristoylforbol-13-acetátem (PMA), který spouští fosforylaci cytosolových podjednotek NADPH-oxidasy přímou aktivací proteinkinasy C (PKC). Jelikož za daných podmínek sanguinarin neovlivňoval aktivitu PKC stimulovanou vlivem PMA, ani nevychytával superoxidový radikál, bylo možné usoudit, že sanguinarin snižuje produkci superoxidu inhibicí aktivity NADPH-oxidasy anebo bráněním vzniku aktivního NADPH-oxidasového komplexu. Tento závěr byl podpořen potlačením inhibičního účinku sanguinarinu thiolovými sloučeninami, které mohou rušit interakci sanguinarinu s SH skupinami oxidasových podjednotek, a také pozorováním inhibice NADPH-oxidasy sanguinarinem v bezbuněčném systému, v němž je aktivita enzymu nezávislá na signálních drahách [35] (příloha 1).

V práci [37] (příloha 4) jsme zjistili, že oxidační vzplanutí vyvolané v diferencovaných buňkách HL-60 vlivem fMLP nebo PMA potlačuje také další kvartérní benzo[*c*]fenanthridinový alkaloid chelerythrin ($IC_{50}$ 4,6 a 3,2 μM), zatímco dihydrosanguinarin, dihydrochelerythrin, protopin a berberin oxidační vzplanutí neovlivňovaly. V této studii byl podrobněji prozkoumán vliv sanguinarinu a chelerythrinu na konvenční izoformy PKC (cPKC), které zajišťují nejdůležitější krok v aktivaci NADPH-oxidasy, tj. fosforylaci jejích podjednotek. Aktivita cPKC byla sledována metodou western blotu, a to detekcí substrátů cPKC fosforylovaných na specifických serinových zbytcích. Výsledky ukázaly, že inhibice celkové aktivity cPKC stimulované vlivem PMA

v diferencovaných buňkách HL-60 vyžaduje alespoň 5krát vyšší koncentrace sanguinarinu a chelerythrinu, než jsou koncentrace nutné pro účinnou inhibici vzplanutí. Alkaloidy neovlivňující oxidační vzplanutí, tj. dihydrosanguinarin, dihydrochelerythrin, protopin a berberin, neměly za daných podmínek vliv ani na aktivitu cPKC. Vlivem PMA, který napodobuje působení diacylglycerolu, se cPKC translokují do buněčné membrány, kde fosforylují řadu proteinů. Analýzy buněčného materiálu rozděleného na cytosolovou a membránovou frakci ukázaly, že při koncentracích neovlivňujících celkovou aktivitu cPKC dochází vlivem sanguinarinu i chelerythrinu v cytosolové frakci k poklesu množství fosforylovaného proteinu s hmotností 40–50 kDa a současnému nárůstu hladiny fosforylovaného proteinu s hmotností ~60 kDa. V membránové frakci oba alkaloidy zároveň snížily množství fosforylovaného proteinu s hmotností ~80 kDa. Za stejných podmínek bylo také pozorováno, že sanguinarin ani chelerythrin nenarušují translokaci cPKC (izoformy α a βII) vlivem PMA, ale způsobují defosforylaci jejich autofosforylovaných threoninových zbytků. Z uvedených výsledků vyplývá, že sanguinarin i chelerythrin mohou interagovat nejen s PKC, ale i s jednotlivými substráty PKC, čímž ovlivňují jejich fosforylaci anebo lokalizaci, a tím mohou zasahovat do buněčných dějů závislých na aktivitě PKC [37] (příloha 4).

V diferencovaných buňkách HL-60 bylo také zjištěno, že kolchicin, vinkristin a paklitaxel, tj. látky interagující s mikrotubuly, neovlivňují oxidační vzplanutí vyvolané působením fMLP nebo PMA. Tyto výsledky ukazují, že aktivace oxidačního vzplanutí danými stimuly je na mikrotubulech nezávislá [38] (příloha 3).

### **4.2. Aktivace dráhy Keap1–Nrf2** (přílohy 8 a 11)

Prospěšné účinky řady sekundárních metabolitů, včetně např. kvercetinu, souvisí s jejich schopností aktivovat transkripční faktor Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), který reguluje mimo jiné expresi cytoprotektivních a antioxidačních enzymů, např. hemoxygenasy-1, NAD(P)H:chinonoxidoreduktasy 1 či glutathionreduktasy. Za normálních fyziologických podmínek aktivitu Nrf2 inhibuje protein Keap1, který svou vazbou na Nrf2 udržuje tento transkripční faktor v cytoplazmě a umožňuje jeho proteasomální degradaci. Při oxidačním nebo elektrofilním stresu se však Nrf2 z vazby na Keap1 uvolňuje, což vede ke stabilizaci Nrf2, k jeho akumulaci v jádře a k indukci exprese cílových genů. Interakce mezi Nrf2 a Keap1 může být přitom přerušena dvěma mechanismy, a to jednak fosforylací Nrf2

příslušnými proteinkinasami, jednak oxidací nebo kovalentní modifikací určitých cysteinových zbytků v proteinu Keap1 [39].

V práci [40] (příloha 8) jsme studovali, zda protizánětlivá aktivita makleji srdčité (*M. cordata*) může souviset s aktivací dráhy Keap1–Nrf2. Jako ukazatel aktivace této dráhy byla sledována exprese hemoxygenasy-1 (HO-1), což je vysoce induktivní enzym katalyzující rozklad hemu na antioxidant biliverdin, kation $Fe^{2+}$ a oxid uhelnatý, který má při fyziologických koncentracích protizánětlivé účinky [41]. K dispozici jsme měli extrakt z *M. cordata* a jeho hlavní složky, tj. alkaloidy sanguinarin, chelerythrin, protopin a allokryptopin. Bylo zjištěno, že použitý extrakt indukuje po 6 hod. inkubace v myších makrofágových buňkách RAW264.7 expresi HO-1 na úrovni mRNA i proteinu. Ukázalo se, že za tento biologický efekt je odpovědný sanguinarin, který při poměrně nízké koncentraci (2 µM) způsobil jadernou akumulaci Nrf2 a nárůst exprese HO-1. Chelerythrin, protopin a allokryptopin expresi HO-1 neovlivnily. Indukční efekt sanguinarinu byl potlačen sloučeninou SB203580, farmakologickým inhibitorem proteinkinasy p38 z rodiny proteinkinas aktivovaných mitogeny (MAPK). Účinek sanguinarinu v buňkách RAW264.7 byl doprovázen i určitým poklesem životnosti buněk. V primárních kulturách lidských hepatocytů však sanguinarin také zvyšoval množství proteinu HO-1, a to při netoxických koncentracích. Z výsledků vyplývá, že aktivace transkripčního faktoru Nrf2 vlivem sanguinarinu může přispívat k protizánětlivé aktivitě *M. cordata* [40] (příloha 8).

V práci [20] (příloha 11) byly zahrnuty flavonoidy kvercetin, isokvercitrin a taxifolin, kyselina gallová a dva syntetické estery kyseliny gallové, 3-*O*-galloylkvercetin a 7-*O*-galloyltaxifolin. Oba galloylderiváty byly jen slabě cytotoxické vůči buňkám RAW264.7 a byla potvrzena stabilita obou látek z hlediska možné hydrolýzy esterové vazby. Zatímco kvercetin a volná kyselina gallová podle očekávání zvyšovaly v buňkách RAW264.7 expresi HO-1, 3-*O*-galloylkvercetin, isokvercitrin a taxifolin byly neaktivní. Tyto výsledky ukazují, že galloylací nebo glykosylací hydroxylové skupiny na uhlíku C3 ztrácí kvercetin schopnost aktivovat dráhu Keap1–Nrf2. Jako nový induktor exprese HO-1 byl v buňkách RAW264.7 identifikován 7-*O*-galloyltaxifolin, který po 6 hod. a při koncentracích od 25 µM zvyšoval množství mRNA i proteinu HO-1. Tento efekt byl doprovázen zvýšenou produkcí ROS, fosforylací p38 MAPK, ERK (kinasa regulovaná extracelulárními signály) a JNK (c-Jun N-terminální kinasa) a dále jadernou akumulací Nrf2 a úbytkem proteinu Keap1. Zvýšená exprese HO-1 byla potlačena *N*-acetylcysteinem a sloučeninami SB203580 (inhibitor p38 MAPK) a PD98059 (inhibitor ERK), z čehož vyplývá význam ROS a aktivity p38 MAPK a ERK pro indukční účinek 7-*O*-galloyltaxifolinu. Z výsledků lze usoudit, že galloylace

hydroxylové skupiny na uhlíku C7 v molekule taxifolinu přináší nové biologické aktivity. Bylo však také zjištěno, že se 7-*O*-galloyltaxifolin v buňkách RAW264.7 oxiduje na 7-*O*-galloylkvercetin, a nezodpovězenou otázkou proto zatím zůstává, která z obou molekul je odpovědná za biologické účinky [20] (příloha 11).

### 4.3. Interakce s dráhou AhR–CYP1A (přílohy 7, 10 a 13)

Biologicky aktivní sekundární metabolity rostlin se v organismu běžně vyskytují současně s léčivy. Z toho důvodu je nutné studovat také potenciální lékové interakce, při nichž je účinek léku ovlivněn jiným lékem, potravinou, doplňkem stravy apod. Příčinou lékových interakcí jsou změny v metabolismu léčiv vyvolané inhibicí nebo indukcí biotransformačních enzymů a lékových transportérů [42]. Příkladem rostlinných produktů způsobujících klinicky významné lékové interakce je čaj z třezalky tečkované (*Hypericum perforatum*) nebo šťáva z grepů (*Citrus paradisi*). Hyperforin, aktivní obsahová látka extraktu z třezalky, byla identifikována jako induktor cytochromu P450 3A4 (CYP3A4), tedy enzymu metabolizujícího asi 50 % léčiv [43]. Naringenin a bergamottin obsažené v grepové šťávě jsou naopak inhibitory tohoto důležitého enzymu [44]. My jsme se zabývali vlivem vybraných látek na expresi enzymů z podrodiny cytochromů P450 1A (CYP1A), které metabolizují léčiva jako paracetamol, theofylin nebo kofein. Enzymy CYP1A se kromě toho účastní také metabolické aktivace řady prokarcinogenů, včetně polycyklických aromatických uhlovodíků, a indukce těchto enzymů proto představuje rizikový faktor v chemické karcinogenezi. Podrodina CYP1A zahrnuje dva enzymy, z nichž CYP1A1 je exprimován hlavně v mimojaterních tkáních, jako jsou plíce, střevo, ledviny aj., zatímco CYP1A2 je především jaterní enzym. Expresi obou enzymů reguluje receptor pro aromatické uhlovodíky (AhR). Tento transkripční faktor se v neaktivním stavu nachází v cytosolu, avšak po navázání ligandu dochází k jeho translokaci do jádra, dimerizaci s jaderným translokátorem AhR (ARNT) a komplex AhR/ARNT se následně váže na specifické sekvence DNA, tzv. xenobiotické neboli dioxinové responzivní elementy, což vede k aktivaci exprese cílových genů [45].

Mezi aktivátory AhR patří mimo jiné kvercetin, který je nízkoafinitním ligandem tohoto transkripčního faktoru [46]. V práci [47] (příloha 10) jsme porovnali účinky kvercetinu, isokvercitrinu, rutinu a taxifolinu na dráhu AhR–CYP1A v lidské hepatomové buněčné linii HepG2, která na rozdíl od normálních hepatocytů exprimuje pouze CYP1A1 [27]. Výsledky potvrdily, že kvercetin při koncentracích od 25 µM zvyšuje aktivitu AhR a aktivuje promotor genu *CYP1A1*, což vede k nárůstu hladiny mRNA a enzymové aktivity CYP1A1. Tyto efekty

však byly jen mírné ve srovnání s účinkem 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxinu (TCDD), modelového aktivátoru AhR. Isokvercitrin a rutin neměly na rozdíl od kvercetinu vliv na aktivitu AhR, ani na expresi CYP1A1. Z toho vyplývá, že glykosylace na uhlíku C3 ruší schopnost kvercetinu aktivovat AhR *in vitro*. Pro hodnocení účinků glykosidů kvercetinu *in vivo* je však nutné brát v úvahu možnost jejich deglykosylace a uvolnění aktivního aglykonu. V případě taxifolinu byl pozorován zanedbatelný vliv na dráhu AhR–CYP1A s výjimkou velmi slabého, avšak statisticky významného nárůstu hladiny mRNA pro CYP1A1. Metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (HPLC/MS) bylo prokázáno, že tento efekt není doprovázen oxidací taxifolinu na kvercetin. Vzhledem ke strukturní podobnosti s kvercetinem lze předpokládat, že by taxifolin mohl být slabým ligandem AhR. Nižší afinita taxifolinu k AhR ve srovnání s kvercetinem může být vysvětlena poklesem hydrofobicity a ztrátou planárního charakteru molekuly v důsledku absence dvojné vazby mezi uhlíky C2-C3 [47] (příloha 10).

V práci [48] (příloha 7) zaměřené na alkaloidy protopin a allokryptopin byly kromě buněk HepG2 použity také primární kultury lidských hepatocytů. Analýzou genové exprese bylo zjištěno, že oba alkaloidy při koncentracích od 25 µM indukují v buňkách HepG2 expresi genu *CYP1A1* a v lidských hepatocytech expresi genů *CYP1A1* a *CYP1A2*. Tato indukce však byla nízká ve srovnání s účinkem TCDD a nevedla k nárůstu hladiny proteinu, ani enzymové aktivity CYP1A. Metodou reportérového genu bylo v buňkách HepG2 navíc zjištěno, že oba alkaloidy aktivují transkripci genu *CYP1A1*, aniž by současně docházelo k aktivaci AhR, z čehož lze usuzovat, že vliv protopinu i allokryptopinu na expresi CYP1A je na AhR nezávislý [48] (příloha 7).

V práci [49] (příloha 13) byl studován alkaloid palmatin. Strukturně blízký alkaloid berberin byl dříve popsán jako aktivátor AhR [50] a metoda reportérového genu použitá v buňkách HepG2 ukázala, že také palmatin může slabě aktivovat AhR a promotor genu *CYP1A1*. Při koncentracích od 10 µM způsobil palmatin v buňkách HepG2 nárůst hladiny mRNA pro CYP1A1, což bylo doprovázeno i mírným nárůstem jeho enzymové aktivity. Indukční efekt palmatinu však byl nízký ve srovnání s účinkem TCDD nebo berberinu. Na rozdíl od buněk HepG2 pěstovaných v monovrstvě palmatin nezvyšoval aktivitu enzymů CYP1A v systémech bližších podmínkám *in vivo*, tj. v buněčných sferoidech připravených z buněk HepG2 a v primárních kulturách lidských hepatocytů [49] (příloha 13). Z výsledků lze usuzovat, že rostlinné přípravky obsahující isochinolinové alkaloidy protopin, allokryptopin nebo palmatin mohou být považovány za bezpečné vzhledem k možné indukci enzymů CYP1A [48,49] (přílohy 7 a 13).

**4.4. Biotransformace studovaných sloučenin** (přílohy 2, 9, 12 a 14)

Rostlinné sekundární metabolity, stejně jako jiná xenobiotika, podléhají v lidském organismu biotransformačním procesům, na nichž se podílí především střevní tkáň, játra a střevní mikroflóra. Detailní znalost metabolického osudu xenobiotik je důležitá proto, že metabolismus určuje farmakokinetické a farmakodynamické vlastnosti dané látky. Biotransformace xenobiotik zahrnuje obvykle tři fáze. Fázi 1 zajišťují oxidační, redukční, hydratační nebo hydrolytické reakce, jejichž cílem je vytvořit nebo odhalit ve výchozí molekule polární, např. hydroxylovou, funkční skupinu. Účelem fáze 2 je snížení reaktivity vzniklých metabolitů a zvýšení jejich rozpustnosti ve vodě prostřednictvím konjugačních reakcí, jako jsou glukuronidace, sulfatace nebo konjugace s glutathionem. Fáze 3 pak zahrnuje aktivní transport konjugovaných metabolitů mimo buňku, odkud mohou být vyloučeny z organismu žlučí nebo močí [51].

Nejvýznamnější enzymy zapojené do první fáze metabolismu xenobiotik jsou enzymy z rodiny cytochromů P450 (CYP) [52]. V případě sanguinarinu bylo popsáno zmírnění jeho hepatotoxických účinků u myší po předchozím podání 3-methylcholanthrenu, který byl použit jako modelový induktor enzymů CYP1A [53]. V práci [54] (příloha 2) jsme proto studovali, zda je sanguinarin enzymy z podrodiny CYP1A metabolizován. Výsledky ukázaly, že preinkubace s induktory CYP1A, tedy s 3-methylcholanthrenem, β-naftoflavonem nebo TCDD, snižuje cytotoxicitu sanguinarinu v buňkách HepG2 i v primárních kulturách potkaních hepatocytů. Dále bylo zjištěno, že sanguinarin inhibuje ethoxyresorufin-*O*-deethylasovou aktivitu rekombinantních lidských enzymů CYP1A, přičemž CYP1A1 byl inhibován nekompetitivně a CYP1A2 kompetitivně. Tyto výsledky naznačují, že by sanguinarin mohl být substrátem CYP1A2. Analýza metodou HPLC s UV a fluorescenční detekcí však neodhalila žádný metabolit sanguinarinu, který by byl produkován rekombinantními enzymy CYP1A1 a CYP1A2 nebo lidskými jaterními mikrosomy obsahujícími CYP1A2. Z výsledků vyplynulo, že induktory CYP1A hrají jistou roli v detoxikaci sanguinarinu, avšak tento alkaloid není substrátem enzymů CYP1A [54] (příloha 2). Tento jev může být vysvětlen pozdějším zjištěním, že sanguinarin je transformován na dihydrosanguinarin [55] prostřednictvím NAD(P)H:chinonoxidoreduktasy 1 [56], jejíž expresi zvyšují mimo jiné i námi použité induktory CYP1A [57].

Práce [58] (příloha 14) byla zaměřena na transformaci palmatinu, která byla studována s využitím suspenzí lidských hepatocytů a tzv. baktosomů (membránová frakce z *Escherichia coli*) obsahujících hlavní jaterní enzymy první fáze metabolismu xenobiotik, a to

rekombinantní lidský CYP1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 a 3A4. Byla vyvinuta metoda HPLC/MS se separací prováděnou na silikagelové stacionární fázi modifikované kyanopropylovou skupinou, která umožnila současnou detekci palmatinu i jeho metabolitů. Hepatocyty představují metabolicky plně funkční *in vitro* model umožňující studovat první i druhou fázi biotransformace. Bylo zjištěno, že transformace palmatinu v hepatocytech zahrnuje *O*-demethylaci nebo hydroxylaci a že demethylovaný produkt je konjugován sulfatací nebo glukuronidací. Analýzy také ukázaly, že demethylaci palmatinu katalyzuje CYP2D6 a v menší míře také CYP1A2. Výsledky i použitá analytická metoda mohou být aplikovány při dalším studiu biotransformace palmatinu a jiných protoberberinových alkaloidů [58] (příloha 14).

V práci [59] (příloha 9) jsme porovnali retenční chování vybraných flavonoidů (kvercetin, isokvercitrin, rutin, taxifolin) a jejich metabolitů na čtyřech různých stacionárních fázích, a to na silkagelu modifikovaném oktylovou ($C_8$), oktadecylovou ($C_{18}$), fenylovou nebo kyanopropylovou skupinou. Flavonoidy obsahují několik hydroxylových skupin a bez nutnosti první fáze biotransformace mohou podstoupit konjugační reakce. Metodou HPLC/MS bylo zjištěno, že suspenze lidských hepatocytů a primární kultury potkaních hepatocytů přeměňují všechny čtyři flavonoidy na methylderiváty, sulfáty, glukuronidy a methylované glukuronidy. V případě taxifolinu byl navíc pozorován vznik redukovaného (dehydroxylovaného) produktu. Pro jednotlivé metabolity byly popsány fragmentační spektra a další analytické parametry jako retenční časy, selektivita a rozlišení píků. Z chromatografických dat vyplynulo, že polárnější stacionární fáze, tj. fenylová a kyanopropylová, jsou pro účinnou separaci flavonoidů a jejich polárních i méně polárních metabolitů vhodnější než stacionární fáze nepolární ($C_{18}$, $C_8$) [59] (příloha 9).

Silikagelová stacionární fáze modifikovaná fenylovou skupinou byla následně použita při studiu biotransformace syntetických galloylesterů kvercetinu a taxifolinu [60] (příloha 12). Analýzy metodou HPLC/MS ukázaly, že 3-*O*-galloylkvercetin je v suspenzích lidských hepatocytů metabolizován na monoglukuronidy a monomethylderiváty, přičemž oba typy metabolitů vznikaly jako dva polohové izomery. Kromě toho probíhalo také štěpení esterové vazby 3-*O*-galloylkvercetinu za vzniku kvercetinu a kyseliny gallové. Ke štěpení esterové vazby docházelo také v případě 7-*O*-galloyltaxifolinu, kdy uvolněný taxifolin byl konjugován sulfatací nebo glukuronidací. Část 7-*O*-galloyltaxifolinu byla, stejně jako v buňkách RAW264.7 [20] (příloha 11), oxidována na 7-*O*-galloylkvercetin a ten byl štěpen na kvercetin a kyselinu gallovou. Semikvantitativní vyhodnocení dat ukázalo, že 7-*O*-galloyltaxifolin je náchylnější k metabolickým přeměnám než 3-*O*-galloylkvercetin, přičemž po 2 hod. inkubace

bylo přeměněno přibližně 90 %, popř. 20 % jednotlivých látek. Výsledky přinesly základní informace o biotransformaci monogalloylovaných flavonoidů a mohou být aplikovány při studiu strukturně podobných sloučenin [60] (příloha 12).

### 4.5. Vliv metabolické transformace na biologickou aktivitu (přílohy 5, 6 a 15)

Během biotransformačních reakcí dochází ke změnám struktury a s tím souvisejícím změnám biologické aktivity, přičemž může nastat inaktivace (tj. detoxikace), nebo naopak aktivace metabolizované sloučeniny. Na metabolické aktivaci je založeno mimo jiné fungování proléčiv. Mezi rostlinnými sekundárními metabolity je možné považovat za „proléčivo“ například salicin, který je působením střevních bakterií a dále v játrech metabolizován na farmakologicky účinnou kyselinu salicylovou (obr. 1) [8]. Příkladem nežádoucí aktivace rostlinných sloučenin je biotransformace aristolochových kyselin na vysoce reaktivní produkty, které se kovalentně vážou na DNA a způsobují tak nefrotoxicitu a karcinogenitu rostlin z čeledi podražcovitých (*Aristolochiaceae*) [61]. Biologické účinky xenobiotik pozorované *in vivo* mohou být tedy obecně způsobeny nejen výchozími látkami, ale i jejich metabolity, a proto je nutné, aby při studiu mechanismů účinku pomocí *in vitro* modelů byly testovány také relevantní biotransformační produkty [62].

Dosavadní výzkum alkaloidů sanguinarinu a chelerythrinu prokázal v *in vitro* podmínkách jejich významnou cytotoxickou aktivitu vůči různým typům normálních i nádorových buněk [63]. Výsledky toxikologických studií na zvířatech jsou však nejednoznačné a závisí na způsobu podání, které ovlivňuje například distribuci nebo metabolismus testované látky [11]. Cílem prací [64] (příloha 6) a [65] (příloha 5) proto bylo porovnat cytotoxicitu sanguinarinu a chelerythrinu s účinky jejich 5,6-dihydroderivátů, které byly identifikovány jako jedny z hlavních produktů biotransformace obou alkaloidů [55,66]. Experimenty provedené na leukemických buňkách HL-60 ukázaly, že dihydroderiváty sanguinarinu a chelerythrinu jsou méně cytotoxické než příslušné výchozí látky. Například testem životnosti buněk, který hodnotí funkčnost mitochondrií (tzv. MTT test), byl zjištěn cytotoxický účinek sanguinarinu a chelerythrinu, přičemž po 4 hod. inkubace byly pro pokles životnosti stanoveny hodnoty $IC_{50}$ 0,9 μM, popř. 2,6 μM. Dihydrosanguinarin a dihydrochelerythrin přitom po 24 hod. a při nejvyšší testované koncentraci (20 μM) snížily životnost buněk pouze na 52 %, popř. 53 %. Nižší cytotoxicita obou dihydroderivátů byla potvrzena také dalšími metodami, a to testováním integrity a asymetrie buněčné membrány, měřením mitochondriálního membránového potenciálu nebo sledováním aktivity kaspas 3, 8 a 9. Z výsledků vyplývá, že

metabolická redukce iminiové vazby v molekule sanguinarinu nebo chelerythrinu za vzniku příslušných dihydroderivátů představuje detoxifikaci obou alkaloidů [64,65] (přílohy 5 a 6).

Flavonoidy se v rostlinách vyskytují ve formě glykosidů. Jejich biotransformace zahrnuje deglykosylaci a uvolněné aglykony jsou následně převedeny konjugačními reakcemi na sulfáty, glukuronidy nebo methylderiváty [67]. V práci [21] (příloha 15) jsme studovali vliv sulfatace na vybrané účinky kvercetinu, isokvercitrinu a taxifolinu. S využitím bakteriální arylsulfátsulfotransferasy byly připraveny kvercetin-3'-*O*-sulfát, který je jedním z hlavních metabolitů kvercetinu, a dále isokvercitrin-4'-*O*-sulfát a taxifolin-4'-*O*-sulfát. Zhodnocení antiradikálové aktivity v chemickém systému ukázalo, že sulfatace hydroxylové skupiny na kruhu B významně snižuje schopnost všech tří flavonoidů vychytávat 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazylový radikál. Tyto výsledky potvrzují význam katecholové (*o*-dihydroxy) struktury kruhu B pro antiradikálovou aktivitu flavonoidů. Dále bylo zjištěno, že sulfatované flavonoidy na rozdíl od kvercetinu neindukují expresi CYP1A1 v buňkách HepG2 ani expresi HO-1 v buňkách RAW264.7. Sulfatace vnáší do molekuly flavonoidu záporný náboj a přispívá k hydrofilitě výsledné molekuly. Metodou HPLC/MS bylo zjištěno, že intracelulární koncentrace sulfatovaných flavonoidů dosahují v obou typech buněk mnohem nižších hodnot než koncentrace kvercetinu a naopak hodnot srovnatelných s koncentracemi isokvercitrinu, který obsahuje hydrofilní sacharidovou složku. Další analýzy ukázaly, že sulfáty flavonoidů jsou v buňkách HepG2 biotransformovány v menší míře a na menší počet metabolitů než nesulfatované flavonoidy. Všechny tři sulfáty částečně podléhaly desulfataci, kvercetin-3'-*O*-sulfát byl navíc methylován na dva různé monomethylderiváty a taxifolin-4'-*O*-sulfát podléhal oxidaci na kvercetin-4'-*O*-sulfát. V případě taxifolinu vzniklého desulfatací taxifolin-4'-*O*-sulfátu docházelo k resulfataci, přičemž byly nalezeny dva různé monosulfáty odlišné od 4'-*O*-sulfátu. Výsledky ukazují, že sulfatace snižuje *in vitro* biologickou aktivitu flavonoidů, což může souviset s nižším vstupem sulfátů do buněk, popř. s jejich nižší afinitou k cílovým biomolekulám [21] (příloha 15).

## 5. Závěr a budoucí směřování

Habilitační práce shrnuje výsledky studia biologické aktivity a metabolických transformací vybraných alkaloidů a flavonoidů. Při studiu mechanismů antioxidačního působení byly charakterizovány dva inhibitory oxidačního vzplanutí, sanguinarin a chelerythrin. Sanguinarin a 7-*O*-galloyltaxifolin byly identifikovány jako aktivátory transkripčního faktoru Nrf2 a induktory hemoxygenasy-1.

Dále bylo zjištěno, že testované látky mají pouze mírný nebo zanedbatelný vliv na aktivitu transkripčního faktoru AhR a expresi enzymů CYP1A: a) glykosidy kvercetinu na rozdíl od kvercetinu neovlivňují v buňkách HepG2 aktivitu AhR, ani expresi CYP1A1, b) taxifolin způsobuje v buňkách HepG2 statisticky významnou, avšak velmi slabou indukci exprese CYP1A1 na úrovni mRNA, c) protopin a allokryptopin zvyšují pouze na úrovni mRNA expresi CYP1A1 a CYP1A2 v lidských hepatocytech, d) palmatin způsobuje aktivaci AhR a nárůst aktivity CYP1A1 v buňkách HepG2, avšak ne v lidských hepatocytech.

V metabolických studiích byly popsány produkty transformace přírodních flavonoidů a jejich semisyntetických galloylderivátů v lidských hepatocytech. Byla vyvinuta metoda pro analýzu metabolitů palmatinu a aplikována při studiu jeho transformace hepatocyty a rekombinantními cytochromy P450. Dále bylo zjištěno, že induktory enzymů CYP1A snižují cytotoxicitu sanguinarinu a že sanguinarin inhibuje aktivitu CYP1A, avšak není těmito enzymy metabolizován. Při studiu vlivu metabolických přeměn na biologickou aktivitu vybraných sloučenin bylo zjištěno, že redukce sanguinarinu a chelerythrinu na příslušné 5,6-dihydroderiváty je spojena s významným poklesem cytotoxicity. Bylo také pozorováno, že sulfatace flavonoidů způsobuje pokles jejich antiradikálové aktivity a může vést k omezení vstupu flavonoidů do buněk a ke ztrátě jejich biologické aktivity.

Výsledky přispěly k hlubšímu poznání molekulárních účinků studovaných látek. Jelikož mají rostlinné sekundární metabolity často pleiotropní účinky a také nízkou biodostupnost, soustředí se současný výzkum v oblasti medicinální chemie mimo jiné na syntézu derivátů přírodních látek s vhodnějšími fyzikálně-chemickými a cílenými biologickými vlastnostmi. Hlavním směrem mého dalšího výzkumu bude biologické testování analogů přírodních látek, jako jsou deriváty fenolových sloučenin nebo sloučeniny obsahující cyklopentendionový či furanonový kruh.

## 6. Seznam použité literatury


[1] Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG. Natural products (secondary metabolites). In *Biochemistry & Molecular Biology of Plants* (eds. Buchanan B, Gruissem W, Jones R) 1250-1318 (American Society of Plant Physiologists, Beltsville, MD, USA, 2000).

[2] Wink M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 2003;64(1):3-19.

[3] Efferth T, Koch E. Complex interactions between phytochemicals. The multi-target therapeutic concept of phytotherapy. *Curr. Drug Targets* 2011;12(1):122-32.

[4] Wink M. Evolutionary advantage and molecular modes of action of multi-component mixtures used in phytomedicine. *Curr. Drug Metab.* 2008;9(10):996-1009.

[5] Peluso I, Palmery M. Flavonoids at the pharma-nutrition interface: Is a therapeutic index in demand? *Biomed. Pharmacother.* 2015;71:102-7.

[6] Gurib-Fakim A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol. Aspects Med.* 2006;27(1):1-93.

[7] Abenavoli L, Capasso R, Milic N, Capasso F. Milk thistle in liver diseases: Past, present, future. *Phytother. Res.* 2010;24(10):1423-32.

[8] Shara M, Stohs SJ. Efficacy and safety of white willow bark (*Salix alba*) extracts. *Phytother. Res.* 2015;29(8):1112-6.

[9] Grycova L, Dostal J, Marek R. Quaternary protoberberine alkaloids. *Phytochemistry* 2007;68(2):150-75.

[10] Vacek J, Walterova D, Vrublova E, Simanek V. The chemical and biological properties of protopine and allocryptopine. *Heterocycles* 2010;81(8):1773-89.

[11] Zdarilova A, Malikova J, Dvorak Z, Ulrichova J, Simanek V. Kvartérní isochinolinové alkaloidy sanguinarin a chelerythrin. Účinky *in vitro* a *in vivo*. *Chem. Listy* 2006;100(1):30-41.

[12] Modriansky M, Dvorak Z. Microtubule disruptors and their interaction with biotransformation enzymes. *Biomed. Pap.-Olomouc* 2005;149(2):213-5.

[13] Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004;79(5):727-47.

[14] Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouysegu L. Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011;50(3):586-621.

[15] Russo M, Spagnuolo C, Tedesco I, Bilotto S, Russo GL. The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: Facts and fancies. *Biochem. Pharmacol.* 2012;83(1):6-15.

[16] Chua LS. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. *J. Ethnopharmacol.* 2013;150(3):805-17.

[17] Valentova K, Vrba J, Bancirova M, Ulrichova J, Kren V. Isoquercitrin: Pharmacology, toxicology, and metabolism. *Food Chem. Toxicol.* 2014;68:267-82.

[18] Weidmann AE. Dihydroquercetin: More than just an impurity? *Eur. J. Pharmacol.* 2012;684(1-3):19-26.

[19] Chen C, Yu R, Owuor ED, Kong AN. Activation of antioxidant-response element (ARE), mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and caspases by major green tea polyphenol components during cell survival and death. *Arch. Pharm. Res.* 2000;23(6):605-12.

[20] Vrba J, Gazak R, Kuzma M, Papouskova B, Vacek J, Weiszenstein M, Kren V, Ulrichova J. A novel semisynthetic flavonoid 7-*O*-galloyltaxifolin upregulates heme

oxygenase-1 in RAW264.7 cells via MAPK/Nrf2 pathway. *J. Med. Chem.* 2013;56(3):856-66.

[21] Roubalova L, Purchartova K, Papouskova B, Vacek J, Kren V, Ulrichova J, Vrba J. Sulfation modulates the cell uptake, antiradical activity and biological effects of flavonoids in vitro: An examination of quercetin, isoquercitrin and taxifolin. *Bioorg. Med. Chem.* 2015;23(17):5402-9.

[22] Collins SJ. The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: Proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood* 1987;70(5):1233-44.

[23] Darzynkiewicz Z, Juan G, Li X, Gorczyca W, Murakami T, Traganos F. Cytometry in cell necrobiology: Analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry* 1997;27(1):1-20.

[24] Karlsson A, Dahlgren C. Assembly and activation of the neutrophil NADPH oxidase in granule membranes. *Antioxid. Redox Signal.* 2002;4(1):49-60.

[25] Raschke WC, Baird S, Ralph P, Nakoinz I. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell* 1978;15(1):261-7.

[26] Oh GS, Pae HO, Lee BS, Kim BN, Kim JM, Kim HR, Jeon SB, Jeon WK, Chae HJ, Chung HT. Hydrogen sulfide inhibits nitric oxide production and nuclear factor-κB via heme oxygenase-1 expression in RAW264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Free Radic. Biol. Med.* 2006;41(1):106-19.

[27] Wilkening S, Stahl F, Bader A. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metab. Dispos.* 2003;31(8):1035-42.

[28] Monostory K, Pascussi JM, Kobori L, Dvorak Z. Hormonal regulation of CYP1A expression. *Drug Metab. Rev.* 2009;41(4):547-72.

[29] Gupta SC, Kim JH, Prasad S, Aggarwal BB. Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals. *Cancer Metastasis Rev.* 2010;29(3):405-34.

[30] Romano B, Pagano E, Montanaro V, Fortunato AL, Milic N, Borrelli F. Novel insights into the pharmacology of flavonoids. *Phytother. Res.* 2013;27(11):1588-96.

[31] Kim MH, Kim SH, Yang WM. Mechanisms of action of phytochemicals from medicinal herbs in the treatment of Alzheimer's disease. *Planta Med.* 2014;80(15):1249-58.

[32] Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic. Biol. Med.* 2010;49(11):1603-16.

[33] Prochazkova D, Bousova I, Wilhelmova N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* 2011;82(4):513-23.

[34] Perisic O, Wilson MI, Karathanassis D, Bravo J, Pacold ME, Ellson CD, Hawkins PT, Stephens L, Williams RL. The role of phosphoinositides and phosphorylation in regulation of NADPH oxidase. *Adv. Enzyme Regul.* 2004;44:279-98.

[35] Vrba J, Hrbac J, Ulrichova J, Modriansky M. Sanguinarine is a potent inhibitor of oxidative burst in DMSO-differentiated HL-60 cells by a non-redox mechanism. *Chem.-Biol. Interact.* 2004;147(1):35-47.

[36] Agarwal S, Reynolds MA, Pou S, Peterson DE, Charon JA, Suzuki JB. The effect of sanguinarine on human peripheral blood neutrophil viability and functions. *Oral Microbiol. Immunol.* 1991;6(1):51-61.

[37] Vrba J, Dvorak Z, Ulrichova J, Modriansky M. Conventional protein kinase C isoenzymes undergo dephosphorylation in neutrophil-like HL-60 cells treated by chelerythrine or sanguinarine. *Cell Biol. Toxicol.* 2008;24(1):39-53.

[38] Vrba J, Modriansky M. *N*-formyl-Met-Leu-Phe-induced oxidative burst in DMSO-differentiated HL-60 cells requires active Hsp90, but not intact microtubules. *Biomed. Pap.-Olomouc* 2004;148(2):141-4.
[39] Surh YJ, Kundu JK, Na HK. Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. *Planta Med.* 2008;74(13):1526-39.
[40] Vrba J, Orolinova E, Ulrichova J. Induction of heme oxygenase-1 by *Macleaya cordata* extract and its constituent sanguinarine in RAW264.7 cells. *Fitoterapia* 2012;83(2):329-35.
[41] Otterbein LE, Soares MP, Yamashita K, Bach FH. Heme oxygenase-1: Unleashing the protective properties of heme. *Trends Immunol.* 2003;24(8):449-55.
[42] Brantley SJ, Argikar AA, Lin YS, Nagar S, Paine MF. Herb-drug interactions: Challenges and opportunities for improved predictions. *Drug Metab. Dispos.* 2014;42(3):301-17.
[43] Komoroski BJ, Zhang S, Cai H, Hutzler JM, Frye R, Tracy TS, Strom SC, Lehmann T, Ang CY, Cui YY, Venkataramanan R. Induction and inhibition of cytochromes P450 by the St. John's wort constituent hyperforin in human hepatocyte cultures. *Drug Metab. Dispos.* 2004;32(5):512-8.
[44] Hodek P, Trefil P, Stiborova M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chem.-Biol. Interact.* 2002;139(1):1-21.
[45] Stejskalova L, Dvorak Z, Pavek P. Endogenous and exogenous ligands of aryl hydrocarbon receptor: Current state of art. *Curr. Drug Metab.* 2011;12(2):198-212.
[46] Ciolino HP, Daschner PJ, Yeh GC. Dietary flavonols quercetin and kaempferol are ligands of the aryl hydrocarbon receptor that affect CYP1A1 transcription differentially. *Biochem. J.* 1999;340(Pt 3):715-22.
[47] Vrba J, Kren V, Vacek J, Papouskova B, Ulrichova J. Quercetin, quercetin glycosides and taxifolin differ in their ability to induce AhR activation and CYP1A1 expression in HepG2 cells. *Phytother. Res.* 2012;26(11):1746-52.
[48] Vrba J, Vrublova E, Modriansky M, Ulrichova J. Protopine and allocryptopine increase mRNA levels of cytochromes P450 1A in human hepatocytes and HepG2 cells independently of AhR. *Toxicol. Lett.* 2011;203(2):135-41.
[49] Vrba J, Havlikova M, Gerhardova D, Ulrichova J. Palmatine activates AhR and upregulates CYP1A activity in HepG2 cells but not in human hepatocytes. *Toxicol. Vitro* 2014;28(4):693-9.
[50] Vrzal R, Zdarilova A, Ulrichova J, Blaha L, Giesy JP, Dvorak Z. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by berberine in HepG2 and H4IIE cells: Biphasic effect on CYP1A1. *Biochem. Pharmacol.* 2005;70(6):925-36.
[51] Chen XW, Serag ES, Sneed KB, Zhou SF. Herbal bioactivation, molecular targets and the toxicity relevance. *Chem.-Biol. Interact.* 2011;192(3):161-76.
[52] Pelkonen O, Maenpaa J, Taavitsainen P, Rautio A, Raunio H. Inhibition and induction of human cytochrome P450 (CYP) enzymes. *Xenobiotica* 1998;28(12):1203-53.
[53] Williams MK, Dalvi S, Dalvi RR. Influence of 3-methylcholanthrene pretreatment on sanguinarine toxicity in mice. *Vet. Hum. Toxicol.* 2000;42(4):196-8.
[54] Vrba J, Kosina P, Ulrichova J, Modriansky M. Involvement of cytochrome P450 1A in sanguinarine detoxication. *Toxicol. Lett.* 2004;151(2):375-87.
[55] Psotova J, Klejdus B, Vecera R, Kosina P, Kuban V, Vicar J, Simanek V, Ulrichova J. A liquid chromatographic-mass spectrometric evidence of dihydrosanguinarine as a first metabolite of sanguinarine transformation in rat. *J. Chromatogr. B* 2006;830(1):165-72.

[56] Zhang DS, Liu ZY, Li YJ, Sun ZL. NQO1 involves in the imine bond reduction of sanguinarine and recombinant adeno-associated virus mediated NQO1 overexpression decreases sanguinarine-induced cytotoxicity in rat BRL cells. *Toxicol. Lett.* 2014;225(1):119-29.

[57] Brauze D, Widerak M, Cwykiel J, Szyfter K, Baer-Dubowska W. The effect of aryl hydrocarbon receptor ligands on the expression of *AhR*, *AhRR*, *ARNT*, *Hif1α*, *CYP1A1* and *NQO1* genes in rat liver. *Toxicol. Lett.* 2006;167(3):212-20.

[58] Vrba J, Papouskova B, Pyszkova M, Zatloukalova M, Lemr K, Ulrichova J, Vacek J. Metabolism of palmatine by human hepatocytes and recombinant cytochromes P450. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2015;102:193-8.

[59] Vacek J, Papouskova B, Kosina P, Vrba J, Kren V, Ulrichova J. Biotransformation of flavonols and taxifolin in hepatocyte *in vitro* systems as determined by liquid chromatography with various stationary phases and electrospray ionization-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 2012;899:109-15.

[60] Vacek J, Papouskova B, Vrba J, Zatloukalova M, Kren V, Ulrichova J. LC-MS metabolic study on quercetin and taxifolin galloyl esters using human hepatocytes as toxicity and biotransformation *in vitro* cell model. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2013;86:135-42.

[61] Stiborova M, Frei E, Schmeiser HH. Aristolochové kyseliny a ledvinové onemocnění "Chinese herbs nephropathy". *Chem. Listy* 2000;94(3):186-9.

[62] Kroon PA, Clifford MN, Crozier A, Day AJ, Donovan JL, Manach C, Williamson G. How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols *in vitro*? *Am. J. Clin. Nutr.* 2004;80(1):15-21.

[63] Slaninova I, Pencikova K, Urbanova J, Slanina J, Taborska E. Antitumour activities of sanguinarine and related alkaloids. *Phytochem. Rev.* 2014;13(1):51-68.

[64] Vrba J, Dolezel P, Vicar J, Ulrichova J. Cytotoxic activity of sanguinarine and dihydrosanguinarine in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Toxicol. Vitro* 2009;23(4):580-8.

[65] Vrba J, Dolezel P, Vicar J, Modriansky M, Ulrichova J. Chelerythrine and dihydrochelerythrine induce G1 phase arrest and bimodal cell death in human leukemia HL-60 cells. *Toxicol. Vitro* 2008;22(4):1008-17.

[66] Vacek J, Papouskova B, Kosina P, Galandakova A, Ulrichova J. Mass spectrometric investigation of chelerythrine and dihydrochelerythrine biotransformation patterns in human hepatocytes. *J. Chromatogr. B* 2013;941:17-24.

[67] Beekmann K, Actis-Goretta L, van Bladeren PJ, Dionisi F, Destaillats F, Rietjens IM. A state-of-the-art overview of the effect of metabolic conjugation on the biological activity of flavonoids. *Food Funct.* 2012;3(10):1008-18.

## 7. Seznam komentovaných publikací

Chronologický seznam publikací tvořících habilitační spis (viz přílohy):

1. Vrba J., Hrbáč J., Ulrichová J., Modrianský M. Sanguinarine is a potent inhibitor of oxidative burst in DMSO-differentiated HL-60 cells by a non-redox mechanism. *Chemico-Biological Interactions* 147(1), 35-47 (2004). ($IF_{2004}$ 2,789)
2. Vrba J., Kosina P., Ulrichová J., Modrianský M. Involvement of cytochrome P450 1A in sanguinarine detoxication. *Toxicology Letters* 151(2), 375-387 (2004). ($IF_{2004}$ 2,571)
3. Vrba J., Modrianský M. *N*-formyl-Met-Leu-Phe-induced oxidative burst in DMSO-differentiated HL-60 cells requires active Hsp90, but not intact microtubules. *Biomedical Papers-Olomouc* 148(2), 141-144 (2004). (Časopis bez IF v roce 2004)
4. Vrba J., Dvořák Z., Ulrichová J., Modrianský M. Conventional protein kinase C isoenzymes undergo dephosphorylation in neutrophil-like HL-60 cells treated by chelerythrine or sanguinarine. *Cell Biology and Toxicology* 24(1), 39-53 (2008). ($IF_{2008}$ 2,155)
5. Vrba J., Doležel P., Vičar J., Modrianský M., Ulrichová J. Chelerythrine and dihydrochelerythrine induce G1 phase arrest and bimodal cell death in human leukemia HL-60 cells. *Toxicology in Vitro* 22(4), 1008-1017 (2008). ($IF_{2008}$ 2,473)
6. Vrba J., Doležel P., Vičar J., Ulrichová J. Cytotoxic activity of sanguinarine and dihydrosanguinarine in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Toxicology in Vitro* 23(4), 580-588 (2009). ($IF_{2009}$ 2,060)
7. Vrba J., Vrublova E., Modriansky M., Ulrichova J. Protopine and allocryptopine increase mRNA levels of cytochromes P450 1A in human hepatocytes and HepG2 cells independently of AhR. *Toxicology Letters* 203(2), 135-141 (2011). ($IF_{2011}$ 3,230)
8. Vrba J., Orolinova E., Ulrichova J. Induction of heme oxygenase-1 by *Macleaya cordata* extract and its constituent sanguinarine in RAW264.7 cells. *Fitoterapia* 83(2), 329-335 (2012). ($IF_{2012}$ 2,231)
9. Vacek J., Papoušková B., Kosina P., Vrba J., Křen V., Ulrichová J. Biotransformation of flavonols and taxifolin in hepatocyte *in vitro* systems as determined by liquid chromatography with various stationary phases and electrospray ionization-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 899, 109-115 (2012). ($IF_{2012}$ 2,487)

10. Vrba J., Kren V., Vacek J., Papouskova B., Ulrichova J. Quercetin, quercetin glycosides and taxifolin differ in their ability to induce AhR activation and CYP1A1 expression in HepG2 cells. *Phytotherapy Research* 26(11), 1746-1752 (2012). ($IF_{2012}$ 2,068)
11. Vrba J., Gažák R., Kuzma M., Papoušková B., Vacek J., Weiszenstein M., Křen V., Ulrichová J. A novel semisynthetic flavonoid 7-*O*-galloyltaxifolin upregulates heme oxygenase-1 in RAW264.7 cells via MAPK/Nrf2 pathway. *Journal of Medicinal Chemistry* 56(3), 856-866 (2013). ($IF_{2013}$ 5,480)
12. Vacek J., Papoušková B., Vrba J., Zatloukalová M., Křen V., Ulrichová J. LC-MS metabolic study on quercetin and taxifolin galloyl esters using human hepatocytes as toxicity and biotransformation in vitro cell model. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 86, 135-142 (2013). ($IF_{2013}$ 2,829)
13. Vrba J., Havlikova M., Gerhardova D., Ulrichova J. Palmatine activates AhR and upregulates CYP1A activity in HepG2 cells but not in human hepatocytes. *Toxicology in Vitro* 28(4), 693-699 (2014). ($IF_{2014}$ 2,903)
14. Vrba J., Papouskova B., Pyszkova M., Zatloukalova M., Lemr K., Ulrichova J., Vacek J. Metabolism of palmatine by human hepatocytes and recombinant cytochromes P450. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 102, 193-198 (2015). ($IF_{2015}$ 3,169)
15. Roubalová L., Purchartová K., Papoušková B., Vacek J., Křen V., Ulrichová J., Vrba J. Sulfation modulates the cell uptake, antiradical activity and biological effects of flavonoids in vitro: An examination of quercetin, isoquercitrin and taxifolin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 23(17), 5402-5409 (2015). ($IF_{2015}$ 2,923)

**Přílohy 1 – 15**