



UNIVERZITA KARLOVA
FAKULTA TĚLESNÉ VÝCHOVY A SPORTU
Kinantropologie



**Vliv biologicky aktivních látek přítomných
v potravinách a potravinových suplementech
na zdraví a fyzický výkon**

HABILITAČNÍ PRÁCE

RNDr. PhDr. Ing. Jana Jaklová Dytrtová, Ph.D.

Praha 2017



CHARLES UNIVERSITY
FACULTY OF PHYSICAL EDUCATION AND SPORT
Kinantropology



**The influence of biologically active compounds
present in foods and food supplements to health and
physical performance**

HABILITATION THESIS

RNDr. PhDr. Ing. Jana Jaklová Dytrtová, Ph.D.

Prague 2017

Poděkování

Děkuji za finanční podporu Grantové agentuře České republiky, grantu č. 13-21409-P, a ÚOCHB AV ČR, v.v.i., internímu grantu č. 2012/82, bez kterých by nemohla fyzicky vzniknout elektrochemická průtoková cela kompatibilní pro *on-line* zapojení před hmotnostní spektrometr sloužící jako vlastní elektrochemické zařízení pro simulaci elektrochemických přeměn studovaných látek. Neméně důležitý dík patří *in memoriam* doc. Dr. Habil. Detlefu Schröderovi, Ph.D., v jehož týmu jsem výzkum spojený s vývojem elektrochemické cely započala, dále děkuji doc. RNDr. Josefu Cvačkovi, Ph.D., který mi umožnil v započatém výzkumu pokračovat ve skupině hmotnostní spektrometrie ÚOCHB AV ČR, v.v.i., kde byla většina experimentů spojená s vývojem a testováním cely provedena. Též děkuji svému manželovi a kolegovi Ing. Michalu Jaklovi, Ph.D., který mě nejen podporoval morálně, ale též se významně podílel na testování a vývoji elektrochemické cely. Velký dík patří RNDr. Ladislavě Součkové, CSc., prof. Ing. Martinu Fuskovi, CSc. a RNDr. Ing. Jaromíru Zahrádkovi, Ph.D. za pomoc při podávání patentů a celkovou licenční politiku. V neposlední řadě děkuji doc. Ing. Tomášovi Navrátilovi, Ph.D. za jeho kritické komentáře i lidskou podporu. Doc. MUDr. Evě Kohlíkové, CSc. děkuji za možnost stát se součástí týmu katedry fyziologie a biochemie a za cenné rady při sepisování práce. Nemalý dík patří i mým kolegům, doc. Mgr. Michalu Strakovi, Ph.D. a RNDr. Jindřichu Fanfrlíkovi, Ph.D., doc. Miroslavu Petrovi, Ph.D. a dalším za spolupráci na publikacích. Tímto děkuji i své širší rodině za všestrannou podporu.

Experimentální část této habilitační práce byla vypracována na Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky, v.v.i.

Prohlašuji, že jsem práci vypracovala samostatně a veškerou použitou literaturu jsem řádně citovala.

V Praze, duben 2017

.....

RNDr. PhDr. Ing. Jana Jaklová Dytrtová, Ph.D.

Obsah

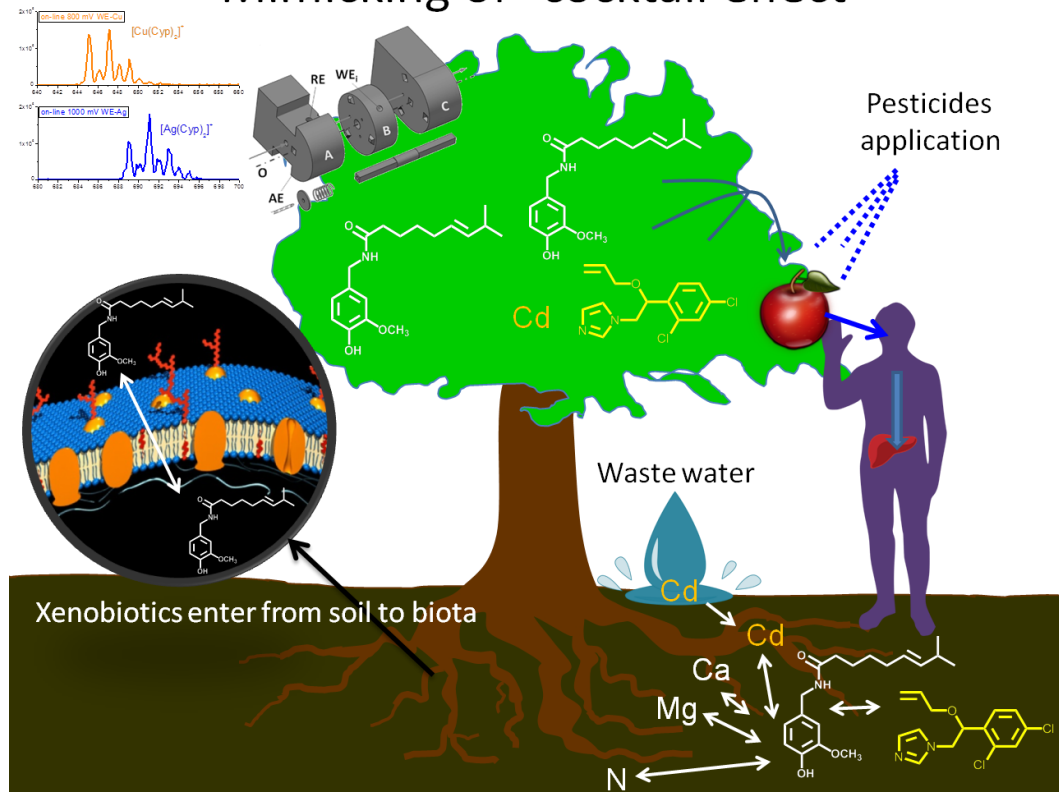
<i>Grafický abstrakt</i>	7
<i>Souhrn</i>	8
<i>Summary</i>	11
Úvod.....	13
Hypotéza habilitační práce	16
Cíle habilitační práce	16
1 Význam výživy ve sportu	17
1.1 Potravinová pyramida a zásady sportovní výživy	18
1.2 Sportovní výživa a její obecná specifika.....	22
1.2.1 Sacharidy.....	22
1.2.2 Lipidy.....	25
1.2.3 Bílkoviny.....	29
1.2.4 Voda	31
1.3 Minerální látky, vitamíny a potravinové suplementy	33
1.3.1 Minerální látky	33
1.3.2 Vitamíny	34
1.3.3 Vybrané potravinové suplementy	38
1.4 Biologicky aktivní látky v potravinách.....	41
1.5 Toxické látky v potravinách.....	44
1.5.1 Rizikové prvky	44
1.5.1.1 Kadmium.....	45
1.5.1.2 Olovo.....	47
1.5.1.3 Zinek.....	48
1.5.1.4 Měď.....	49
1.5.1.5 Železo	49
1.5.1.6 Hliník	50
1.5.2 Pesticidy	50
1.5.2.1 Legislativní rámec využití pesticidů v zemědělství a jeho dodržování	51
1.5.2.2 Negativní účinky pesticidů na fyziologické funkce	53

1.5.2.3	Vliv pesticidů na přenos nervového vzruchu	54
1.5.2.4	Vliv pesticidů na biosyntézu sterolů	55
1.5.2.5	Vliv pesticidů na dýchací řetězec	58
1.6	Kumulativní a koktejlový efekt toxických látek.....	60
1.7	Metabolické přeměny látek	63
1.8	Metody studia látkových přeměn	65
1.8.1	Konvenční metody studia látkových přeměn	65
1.8.2	Mimikování metabolických změn pomocí elektrochemie.....	68
1.8.3	<i>On-line</i> spojení elektrochemických metod s hmotnostní spektrometrií.....	69
1.8.3.1	Výhody plynoucí ze spojení elektrochemie s hmotnostní spektrometrií..	70
1.8.3.2	Elektrochemie v průtoku	71
1.8.3.3	Elektrochemické cely	73
1.8.3.4	Typy elektrod	75
1.9	Vybrané biologicky aktivní látky a jejich vlastnosti.....	77
1.9.1	Resveratrol	77
1.9.1.1	Rozpustnost a absorpce resveratrolu	79
1.9.1.2	Trans/cis izomerizace a jiné deriváty resveratrolu	80
1.9.1.3	Významné interakce resveratrolu.....	80
1.9.1.4	Kritický pohled na účinky resveratrolu na lidské zdraví	82
1.9.1.5	Vznik anti-oxidačních a pro-oxidační forem resveratrolu	83
1.9.1.6	Biotransformace resveratrolu.....	84
1.9.2	Tebukonazol.....	86
1.9.3	Thiram	87
2	Zjednodušený popis experimentálního systému použitého v případové studii.....	89
2.1	Popis elektrochemické cely	89
2.2	Princip elektrochemické přeměny studovaných látek.....	91
2.3	Použité chemikálie v případové studii	92
2.4	Postup měření.....	93
2.4.1	Postup měření pomocí ESI-MS.....	93
2.4.2	Postup měření pomocí EC-ESI-MS	94

3 Případová studie	96
3.1 Chování samotného resveratrolu v podmínkách ESI-MS.....	96
3.2 Interakce resveratrolu s Cu^{2+}	99
3.2.1 Interakce resveratrolu na měděné elektrodě.....	100
3.3 Interakce tebukonazolu s Cu^{2+}	108
3.3.1 Interakce tebukonazolu s CuCl_2	109
3.3.2 Interakce tebukonazolu na měděné elektrodě	110
3.4 Interakce resveratrolu s tebukonazolem.....	111
3.5 Interakce resveratrolu s tebukonazolem a Cu^{2+}	114
3.5.1 Interakce resveratrolu s tebukonazolem a CuCl_2	114
3.5.2 Interakce resveratrolu s tebukonazolem na měděné elektrodě	119
3.5.3 Simulování redukce thiramu	121
4 Závěr.....	123
5 Seznam zkratk	126
6 Použitá literatura.....	127
7 Publikační výstupy spojené s tématem práce, na nichž se autorka podílela.....	148
8 Příložené publikace k tématu.....	148

Grafický abstrakt

Mimicking of "cocktail effect"



Souhrn

Habilitační práce představuje interdisciplinární pohled na vliv výživy sportovců a koktejlového efektu biologicky aktivních látek na sportovní výkon a lidské zdraví. Prolíná se zde nauka o složkách stravy a její vliv na zdraví a výkon sportovců s možností instrumentálního přístupu k experimentálnímu poznávání možných interakcí složek potravy jako jsou biologicky aktivní látky v ní obsažené. V práci je stručně popsáno zařízení a jeho princip, pomocí kterého je možné experimentálně tyto interakce studovat. Podrobné informace k zařízení je možné najít v příložených impaktfaktorových publikacích a patentu autorky. Další část práce se krátce věnuje interakcím některých toxických biologicky aktivních látek, jako jsou pesticidy a některé esenciální prvky, které jsou rovněž autorkou podrobně popsány v příložených impaktfaktorových publikacích. Závěrečná část práce tvoří případová studie představující konkrétní využití instrumentálního přístupu ke studiu interakcí resveratrolu (diskutovaného antioxidantu) s tebukonazolem (druhým nejpoužívanějším pesticidem v Evropě) a mědí (esenciálním vs. rizikovým prvkem).

Znalost a pochopení složitých vztahů biologicky aktivních látek přítomných v potravinách, kam nepatří pouze zdraví prospěšné látky, ale také látky potenciálně lidskému zdraví nebezpečné a toxické, patří mezi výzvy, které jsou položeny k řešení současné vědě. Problematika se dá řešit na několika úrovních, které se vzájemně prolínají, doplňují a podporují. Jednou z možností je studovat tyto interakce na molekulární úrovni pomocí instrumentálních fyzikálně-chemických metod. Moderní pojetí této disciplíny přijalo název „biomimetika“, který v sobě předznamenává, že se vědci snaží nějakým způsobem napodobit děje probíhající v přírodě (v organismu) za poměrně nesnadno definovaných podmínek a přenést je (*ex situ*) do kontrolovaných podmínek instrumentálních metod. Snaží se tedy původní systém zjednodušit tak, aby bylo možné studovat jednotlivé reakce a interakce separátně a pochopit jejich specifika, zákonitosti a mechanismy na molekulární úrovni, které se pak následně snaží dávat do širších souvislostí.

Předložená habilitační práce se zabývá možnostmi spojení elektrochemických metod s hmotnostně spektrometrickými pro studium „biomimetických“ přeměn biologicky aktivních látek (které jsou součástí potravinových suplementů) použitelných ve sportovní výživě. Modelovou biologicky aktivní látkou je v této práci resveratrol, který je posledních 40 let

střídavě považován za všelék a střídavě označován za podvod. Resveratrol je látka považovaná mnoha autory jako antioxidant, který se běžně vyskytuje nejen ve víně, ale lze jej zakoupit i ve formě kapslí jako doporučený prostředek proti stárnutí, kardiovaskulárním chorobám, infekcím, rakovině a dalším lidským neduhům. Ve sportovní výživě se používá k zmírnění negativních dopadů zvýšeného metabolismu souvisejícího se zvýšeným množstvím volných radikálů. Resveratrol by tedy měl snižovat poškození svalů, snižovat únavu a pozitivně podporovat imunitní systém. Autorka se pomocí nově navrženého a zkonstruovaného *on-line* spojení elektrochemické cely s hmotnostním spektrometrem snaží studovat možné interakce resveratrolu jak samotného, tak v přítomnosti mědi, nebo velmi rozšířeného (ve víně téměř vždy přítomného) fungicidu tebukonazolu. V práci je zjednodušeně popsána konstrukce elektrochemické cely (podrobnosti lze nalézt v příloženém patentu), princip jejího fungování (více v příložených impaktovaných publikacích) a možné aplikace na příkladu interakcí resveratrolu, tebukonazolu a mědi.

Prezentované vybrané výsledky v případové studii se opírají především o experimenty prováděné pomocí spojení elektrochemické cely s hmotnostním spektrometrem, o experimenty prováděné pouze v elektrospreji s hmotnostním spektrometrem a také o data získaná z výpočetních metod. Většina výsledků zde uvedených byla publikována v impaktovaných časopisech, patentována, nebo je připravována k brzké publikaci. Výsledky byly interpretovány jako možné molekulární mechanismy reakcí.

Pokud je resveratrol v systému přítomen sám (pouze v rozpouštědle), má tendenci se chovat skutečně jako antioxidant, vytváří dvě deprotonované formy (deprotonovaný resveratrol a jeho dimer). V přítomnosti měďnatého kationtu však dochází k tvorbě radikálu resveratrolu, který se chová jako pro-oxidant. Zajímavé zjištění přinesly studie studující interakce resveratrolu s tebukonazolem, ze kterých vyplývá, že interakce tebukonazolu s resveratolem má stabilizační účinek na jeho (resveratrolu) antioxidační schopnosti. Dále přítomný tebukonazol díky své enormní afinitě vůči kationtům mědi tvoří s mědí komplexy, čímž významně snižuje riziko interakce měďnatých kationtů s resveratolem. Dále tebukonazol tvoří s resveratolem dimerní komplex, který již s měďnatým kationtem nereaguje, aby poskytoval redukovanou (pro-oxidační) formu resveratrolu. Z toho plyne poněkud rozpačité zjištění, že přítomnost fungicidu (ve víně) nemusí mít pouze negativní účinek na lidské zdraví.

Je jasné, že celá problematika chování biologicky aktivních látek v životním prostředí a potažmo v lidském organismu rozhodně není problémem triviálním. Vzájemné interakce biologicky aktivních látek (souborně nazývané „koktejlový efekt“) jsou bezpochyby jednou z nejvýznamnějších výzev pro současnou vědu. Právě pochopení „koktejlového efektu“ je klíčem ke správnému ordinování nejen potravinových suplementů, ale i celé řady léčiv. Stojíme před řadou otázek týkajících se např. různé účinnosti stejné léčby na různé pacienty, různé míry efektu suplementace podpůrnými látkami při stejném dávkování apod., jejich zodpovězení leží právě ve vzájemné interakci (součinnosti) mnoha látek, které lze v současnosti jen stěží dokonale popsat. V případě resveratrolu a jiných „všeléků“ se jejich studiem zabývá celá řada vědeckých pracovišť po celém světě, proto tato mravenčí práce, která vyžaduje znalosti z mnoha oborů a spolupráci celé řady odborníků, jistě v budoucnu přinese své výsledky, které budou využitelné i pro širší veřejnost. Autorka v této souvislosti doufá, že navržená metoda využívající spojení elektrochemických metod s hmotnostně spektrometrickými najde své širší uplatnění.

Summary

Knowledge and understanding of the complex relationships of biologically active substances, which include food supplements used in sports nutrition, among the challenges that are put to solving contemporary science. The issue can be addressed at several levels, which are interconnected, complementary and supporting to each other. One possibility is to study these interactions at the molecular level by instrumental physico-chemical methods. The modern conception of this discipline adopted the name "biomimetics", which in itself anticipates that scientists are trying to somehow simulate the processes occurring in the nature (in the body) under relatively difficult conditions defined for transfer (*ex situ*) in controlled conditions of instrumental methods. It aspires to simplify the original system to individual reactions, which studies can clarify interactions separately and understand their specificity, regularities and mechanisms at the molecular level. Later the knowledge has to be put in a broader context.

Submitted habilitation thesis focuses on the connection of electrochemical methods with mass spectrometric studies for "biomimetic" transformation of dietary supplements useful in sports nutrition. In this work resveratrol is the model food supplement, which is 40 years alternately regarded as a panacea, alternately described as a scam. Resveratrol is a substance which is considered by many authors as an anti-oxidant that normally occurs e.g. in wine, but can be purchased in the form of capsules as recommended prevention to aging, cardiovascular diseases, infections, cancer and other human ailments. In sports nutrition is being used to potentially mitigate the negative effects of increased metabolism associated with increased amounts of free radicals, which is typical for intensive exercise. Resveratrol should therefore reduce muscle damage, reduce fatigue and positively support the immune system. The author is using a newly designed and constructed on-line connection of electrochemical cell with a mass spectrometer trying to study the possible interaction of resveratrol itself and in the presence of copper or widespread (in wine almost always present) fungicide tebuconazole. In the work is described the simplified design of the electrochemical cell (details can be found in the attached patent), the principle of its operation (see the accompanying impact factor publications) and the possible applications on the example of the interaction of resveratrol, tebuconazole and copper.

Presented selected data in the key work is primarily based on the experiments conducted using a combination of electrochemical cell with a mass spectrometer, on the experiments conducted by mass spectrometry and also on the data provided by computational methods. Most of the results listed here were published in journals, patented or is being prepared for prompt publication. The results were interpreted as possible molecular mechanisms of reactions.

If only resveratrol is present in the system (in solvent only) it tends to act effectively as an anti-oxidant creates two deprotonated forms (deprotonated resveratrol and its dimer). In the presence of copper cations, however, leads to the formation of a radical which acts as a pro-oxidant. Interesting findings yielded studies studying interactions of resveratrol and tebuconazole (with/without the presence of copper). The enormous affinity of tebuconazole to copper is responsible for capturing of majority present copper. Moreover tebuconazole creates with resveratrol a dimer adduct, which is resisted to reactions with copper; there are no available places for binding of copper. Hence embarrassing discovery that the presence of the fungicide (in wine) may not only has negative effects on human health.

It is clear that the whole issue of the behavior of biologically active substances in the environment and consequently in the human body is definitely not a trivial problem. Interactions of biologically active substances collectively called "cocktail effect" are undoubtedly one of the most important challenges for modern science. Just understanding the "cocktail effect" is the key to the right administration of not only the dietary supplements, but also of a whole range of drugs. We are faced with a number of questions concerning e.g., various efficiency for equal treatment for different patients, different degrees of effect of supplementation supportive components at the same dose, etc. Their answer lies just in the interactions (synergy) of many substances which can be currently hardly described perfectly. In the case of resveratrol and other "cure" their study addresses a number of scientific institutes around the world, so this painstaking work that requires knowledge of many disciplines and collaboration of a number of experts, certainly in the future, will bear results that will be useful to the wider public. The author in this context hopes that the proposed methods using electrochemical methods in combination with mass spectrometry find their broader application.

Úvod

Tato habilitační práce se zabývá problematikou přítomnosti biologicky aktivních látek (především pesticidů a jejich reziduí) v potravinách (i potravinových suplementech) a jejich vlivu na lidské zdraví i sportovní výkon prostřednictvím jejich působení na některé biochemické pochody. Autorka této habilitační práce se hlásí k odkazu Hippokratovy myšlenky: „Nechť jídlo je tvůj lék a strava bude tvou medicínou“ (*Cibus esse medicinae, medicina sint vobis in escam*).

Pokud má být naše strava zároveň naším lékem, je třeba chápat jak účinek jednotlivých složek stravy, tak se i pokoušet chápat jejich vzájemné interakce a též interakce s přirozenými složkami lidského organismu, a to na molekulární, buněčné, či orgánové úrovni. Speciální odvětví nauky o výživě je výživa sportovní, kde má úprava složení stravy, či zařazení některých jejích složek do jídelníčku, zvýšit výkon sportovců daného zaměření, předejít přetrénování, nebo zvládnout náročnou přípravu, urychlit tréninkovou adaptaci, nebo zmírnit negativní dopady na zdraví (vrcholových) sportovců apod. Vliv složení stravy je často diskutován ve vztahu ke sportovnímu výkonu, přičemž až 80 % celkové výkonnosti a zdraví jedince se odvíjí od složení přijímané stravy. V této diskusi je však opomíjen vliv přítomných xenobiotických látek. Koncentrace těchto nežádoucích látek s biologickými účinky se často pohybují v řádech srovnatelných s koncentrací stopových prvků a látek (např. vitamínů, esenciálních prvků). Jejich koncentrace je sice omezena legislativně danými limity, avšak není brán v úvahu „koktejlový“ a případný synergický efekt těchto látek. Často jsou totiž producenty potravin tyto limity obcházeny tím, že místo jednoho pesticidu je použito několik pesticidů se stejným účinkem; předepsané limity pro jednotlivé pesticidy tedy zůstanou nepřekročeny, ale jejich celkový účinek nejen, že významně naruší/ovlivní biochemické pochody, ale může vést i k poměrně závažným poruchám.

Sportovní výživa je v současné chvíli velmi potenciální součástí vědního oboru kinantropologie (o pohybu člověka), která se dosud převážně formuje na empirických základech. Tato práce se pokouší o molekulární pohled na aktivitu (reaktivitu) vybraných biologicky aktivních látek a možnosti experimentálního studia vlivu složek stravy na lidský organismus. Důraz je kladen zejména na vliv nežádoucích xenobiotických látek přítomných v potravinách, jako jsou pesticidy, ale i případně žádoucí látky jako je např. resveratrol.

Autorka si uvědomuje, že potrava je z (bio)chemického hlediska nehomogenní a mnohosložková, proto je při studování vlivu jejího složení na sportovní výkon i zdraví jedinců nutno se potýkat s mnoha nelehkými překážkami, které zahrnují vznik metabolitů biologicky aktivních látek (v užším smyslu slova látek s předpokládaným pozitivním účinkem z hlediska správné sportovní výživy), koktejlový efekt a další fenomény. Existuje zde značné riziko, že nedostatečné pochopení vztahů mezi v potravě obsaženými biologicky aktivními látkami a jejich metabolity může být i fatální, anebo přinejmenším nepovede ke kýženému pozitivnímu efektu. Ohledně účinků některých biologicky aktivních látek (do kterých patří všechny látky, které nějak katalyzují biochemické procesy v organismu (bílkoviny (koenzymy), (pro)vitamíny, ale i pesticidy, léčiva, antioxidanty...)) panuje v široké veřejnosti celá řada mýtů a polopravd. Z těchto důvodů se tato habilitační práce pokouší (i) shrnout negativní účinky přítomnosti pesticidů v potravě, (ii) kriticky zhodnotit především přínos aktuálně velmi populární molekuly resveratrolu a také (iii) přiblížit instrumentální metodu sloužící k *ex situ* simulování (mimikování) reakcí biologicky aktivních látek a přispět ke studiu interakcí biologicky aktivních látek na molekulární úrovni. V práci je popsáno elektrochemické zařízení, jehož je autorka hlavním navrhovatelem i konstruktérem, které po zapojení před hmotnostní spektrometr umožňuje studovat redoxní reakce vybraných chemických látek (potenciální přeměny biologicky aktivních látek) a detekovat jejich potenciální metabolity. Tento fyzikálně chemický přístup může poměrně rychlým, levným a efektivním způsobem napomoci zkoumat velmi složité biochemické vztahy (reakce, interakce, sorpce a další), které mohou nastat po požití potravy obsahující biologicky aktivní látku/y. Autorka si uvědomuje, že se jedná o jeden z možných přístupů ke studiu vlivu složek potravy na lidské zdraví a fitness, přičemž pouze komplexní přístup kombinující *in vivo*, *in vitro* a experimentální *ex situ* přístupy a výpočtovou chemii mohou podat komplexnější a pravdivější pohled na problematiku.

Práce se opírá o vlastní český patent a 14 článků publikovaných v impaktfaktorových časopisech a dalších publikacích. Výsledky využité v práci byly částečně získány s finanční podporou grantu GAČR č. 13-21409-P, grantu ÚOCHB AV ČR, v.v.i. č. 2012/82 a grantu GAUK č. 134215.

Habilitační práce se soustředí na charakterizování jednotlivých složek potravy z hlediska využití energie, snadnosti oxidace substrátu a rychlosti utilizace energie v souvislosti se

sportovním výkonem. Dále je pozornost věnována popisu působení rizikových prvků a pesticidů v organismu a metabolickým přeměnám xenobiotických látek s experimentálními možnostmi jejich studia. Výzkumný přínos autorky je zde shrnut do stručného popisu metody využívající elektrochemické cely *on-line* zapojené před hmotnostní spektrometr, nicméně pro potřeby habilitační práce byl tento popis výrazně zjednodušen, podrobnější popis lze nalézt jak v příloženém patentu, tak v publikaci v časopisu *Electrochimica Acta*. Představená metoda slouží jako doplněk, či substituce nákladných biochemických technik a studií (v případě, kdy je jejich provádění buď nemožné, nebo neetické). Poslední část habilitační práce je věnována případové studii zabývající se interakcí resveratrolu („populární“ antioxidant) s tebukonazolem (v ČR druhý nejčastěji používaný pesticid) v přítomnosti měďnatých kationtů. Je nutno ovšem zdůrazňovat, že se jedná o metodu *ex situ*, a výsledky z ní plynoucí je třeba (pokud je to možné) diskutovat a korelovat s daty získanými zavedenými biochemickými studii, aby závěry z nich plynoucí mohly být akceptovány jako platná fakta. Je zde nutný kritický přístup a potřeba neustále klást otázky, protože simulování skutečných biochemických systémů v sobě zahrnuje obecně větší počet aproximací, které mohou samotný výsledek studie modifikovat.

Hypotéza habilitační práce

Biologicky aktivní látky (včetně látek toxických) v potravinách ovlivňují základní metabolické pochody, čímž se projeví (na sportovním výkonu) v podobě:

- (i) nedostatečné (opožděné) oxidace substrátu a s tím souvisejícího rychlejšího nástupu únavy,
- (ii) narušení biosyntézy sterolů vedoucí k narušení rovnováhy pohlavních hormonů, změněného průběhu stresové reakce a snížením stability biomembrán,
- (iii) blokování přenosu nervového vzruchu především u acetylcholinových receptorů (např. nervosvalové ploténce) vedoucí až ke křečím, či znehybnění,
- (iv) prodloužení otevření sodíkových kanálů během akčního potenciálu (v mozku i na nervosvalové ploténce, jehož důsledkem je prodloužení délky akčního potenciálu a tím prodloužení reakční doby.

Cíle habilitační práce

Hlavním cílem bylo vyvinout metodu, která by umožňovala studovat redoxní reakce vybraných biologicky aktivních (xenobiotických) látek *ex situ*, bez vlivu matrice fyziologického prostředí, tedy využít vyvíjenou elektrochemickou průtokovou celu (EC) kompatibilní pro zapojení před hmotnostní spektrometr s ionizací elektrosprejem (ESI-MS).

Dalším cílem bylo shrnout, jaké nežádoucí účinky mají xenobiotické látky s biologickou aktivitou na (i) metabolické pochody s ohledem na využití a uvolňování energie oxidací substrátu během sportovního výkonu, (ii) práci svalů na úrovni přenosu vzruchu a (iii) biosyntézu důležitých komponent biologických membrán (cholesterolu) a hormonů odvozených od sterolů, které zásadním způsobem ovlivňují metabolismus i stresovou reakci, čímž ovlivňují jak rychlost nástupu únavy během sportovního tréninku, tak i průběh stresové reakce během závodů.

1 Význam výživy ve sportu

Složení a množství stravy zásadním způsobem ovlivňuje jak lidské zdraví, tak i schopnost podávat fyzické (tedy i sportovní) výkony, tak i naši intelektuální aktivitu. Dostatečný přísun energie je nutnou podmínkou kvalitního sportovního výkonu (Mandelová a Hrnčířiková 2007). Mezi sportujícími a nespportujícími jedincem je právě největší rozdíl v rozdílné spotřebě potravy (Neumann *et al.* 2005). Pokud pomineme fakt, že většina „nesportující“ české populace má energetický příjem potravy větší než výdej, tak podle klíče „více vydané energie“ = „větší spotřeba potravy“ vyplývá, že právě sportovci jsou více ohroženi vystavením cizorodým nežádoucím látkám přítomným v potravinách. S vyšší spotřebou potravin samozřejmě souvisí i vyšší riziko expozice nežádoucím látkám v potravinách, proto vzhledem ke kumulativnímu charakteru většiny cizorodých látek v potravinách jsou více ohroženi právě lidé se zvýšeným příjmem potravy, tedy i sportovci.

Sportovní výživa má plnit čtyři základní funkce (Clark 2014b): (i) předcházení hypoglykemie a zmírnění jejích příznaků (svalová i celková únava, závratě, rozostřené vidění a další), (ii) zklidnění orexigenního centra v mozku související s aktivitou prázdného žaludku, (iii) vytvoření dostatečných zásob svalového i jaterního glykogenu a (iv) předejít stresovým reakcím spojených s chronickou i akutní podvýživou, které mají dopad na emoční i mentální profil jedince a samozřejmě také (v) zvýšit jeho vydrž při sportovním výkonu a oddálit nástup únavy.

To, že je správná výživa u vrcholových sportovců zcela zásadní a je jí přikládán velký význam, je všeobecně akceptováno (např. Fořt (2002)). Nicméně správně sestavený jídelníček je zejména důležitý i pro nevrcholové a rekreační sportovce a samozřejmě pro děti a dorost. Dlouhodobě nevhodná výživa je příčinou až 60 % různých onemocnění (Fořt 2002). Současný obraz zdraví společnosti lze ještě doplnit o fakt, že celkový životní styl spojený s fyzickou aktivitou též zásadním způsobem ovlivňuje zdravotní stav jedince a potažmo i celé populace. Problém znalosti správné životosprávy a zdravého životního stylu celé populace lze v budoucnu vyřešit doplňujícími vzdělávacími programy již na úrovni školních a předškolních zařízení. V tomto směru lze vysledovat konkrétní snahy, např. projekt Státního zemědělského intervenčního fondu Ovoce a zelenina do škol je spolufinancován Evropskou unií

(www.ovocedoskol.szif.cz) nebo např. portál ministerstva zemědělství: „víš, co jíš?“, který se věnuje prevenci vzniku špatných stravovacích návyků na úrovni rodin.

Na druhé straně se běžná přítomnost cizorodých látek v potravinách a potravinových suplementech zatím racionálním způsobem na národní úrovni neřeší. Není možné zajistit výživu celé populace pouze pomocí biopotravin. Navzdory různým poplašným zprávám není většina potravin dostupných v České republice zdraví nebezpečná (Hajšlová 2015). To ale není případ potravinových suplementů, kdy podle tvrzení prof. Jany Hajšlové až 2/3 potravinových suplementů buď obsahují zdraví nebezpečné látky, nebo obsahují látky, které nejsou deklarovány výrobcem, či neobsahují ony deklarované látky (Hajšlová a Bobůrková 2017).

Také nejsou popsány účinky všech legislativou povolených cizorodých látek k produkci potravin na úrovni jejich molekulárního působení a úrovni působení na ekosystém. Zejména problematické je postihnout koktejlový efekt těchto látek, či synergické působení a jejich metabolické přeměny včetně vzniku jejich velmi reaktivních (s krátkou dobou výskytu) metabolitů.

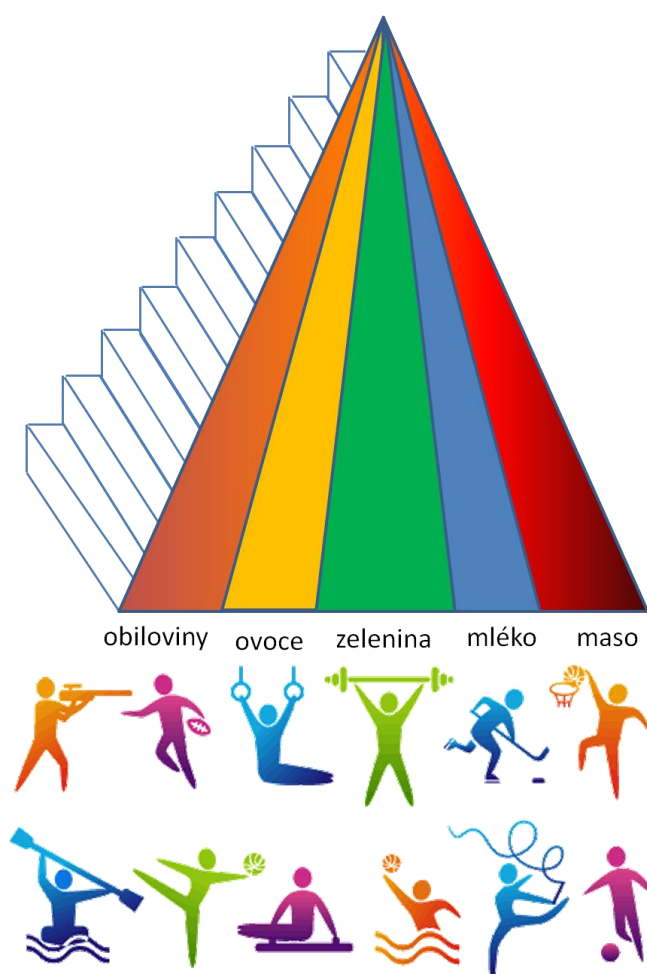
S ohledem na typ pohybových, či intelektuálních aktivit, které jsou vykonávány, lze poměrně přesně sestavit optimalizovaný jídelníček pro konkrétní osobu. Při vypracovávání stravovacího plánu hraje roli především (i) typ pohybové aktivity (sportu), (ii) její intenzita a (iii) frekvence, (iv) pohlaví a (v) věk.

Tato kapitola se věnuje popisu jednotlivých složek jídelníčku sportovce, s ohledem na jejich zastoupení a účinky během tréninku i soutěže.

1.1 Potravinová pyramida a zásady sportovní výživy

Pro přibližnou orientaci v oblasti výživy (nejen pro sportovce) slouží tzv. potravinová pyramida (**obr. 1**), která představuje pomyslné penzum stravy a udává přibližný podíl jednotlivých složek stravy. Nejčastěji se potrava dělí komoditně na: (i) zeleninu, (ii) ovoce, (iii) obiloviny, (iv) maso a (v) mléčné výrobky. Existuje několik pohledů na strukturu potravinové pyramidy. Často se udává horizontální členění pyramidy, kdy je její základna tvořena buď zeleninou, nebo obilovinami, následovaná ovocem, mléčnými výrobky a na vrcholu jsou produkty z masa. Z hlediska objemového členění je toto „klasické“ horizontální

členění z hlediska sportovní výživy nedostačující a hlavně nejednotné. Názory na správné složení stravy se v průběhu posledních několika desetiletí měnily, někdy i velmi dramaticky. Lze zde zmínit např. tzv. „vaječnou fobii“, která se rozmáhala především v 90. letech minulého století z důvodu obav před cholesterolem, na nějž je především vaječný žloutek velmi bohatý. Případně ještě stojí za zmínku, že již dlouho jsou zatracovány tuky jako nedílná součást lidské potravy, anebo se v poslední době stal „strašákem“ správných stravovacích návyků lepek.



Obr. 1. Potravinová pyramida (upraveno dle Clark (2014a)).

Potravinová pyramida (**obr. 1**) záměrně neudává nadřazenost některých složek nad potravinami jinými, protože v případě návrhu ideálního jídelníčku musíme zastoupení jednotlivých složek potravy volit s ohledem na typ provozovaného sportu i individuality samotného sportovce (Dlouhá 1998).

Při vypracovávání vhodného jídelníčku pro sportovce je nutné brát na zřetel (Burke 2007):

- (1) dostatečné pokrytí energetických nároků spojených se sportovním výkonem,
- (2) dosažení a udržení ideálních tělesných proporcí pro budoucí sportovní události
 - a. uzpůsobením struktury, náplně a četnosti tréninků,
 - b. optimalizací výživy z hlediska množství energie, složení cukrů, tuků i bílkovin,
- (3) dostatečné pokrytí veškerých potřebných živin za účelem zlepšení adaptace a výkonu,
- (4) doplňování energie a plnění pitného režimu po každém tréninku pro nadcházející sportovní události,
- (5) zkoušení optimální navržené výživové strategie,
- (6) udržování optimálního zdravotního stavu dodáváním živin důležitých pro sportovní výkon,
- (7) snahu o snižování rizika nemocí a zranění
 - a. podporou imunitního systému,
 - b. udržováním energetické rovnováhy,
 - c. dostatečným a vhodným odpočinkem,
- (8) volbu vhodných potravinových doplňků,
- (9) dlouhodobé dodržování správných stravovacích návyků.

Důležité je také správné rozložení potravy během dne a dodržování pitného režimu. Doporučuje se 5 až 6 porcí jídla během dne a tekutiny nealkoholické a neslazené (Fořt 2004; Podstatová 2009).

Pro sportovce je též důležité znát a dodržovat zásady příjmu potravy před, během a po sportovní aktivitě. Dodržování zásad, popř. jejich individualizovaná úprava, má vést k dosažení maximálního sportovního výkonu. Pro každý sport jsou vžité částečně odlišné stravovací zásady, v následujícím seznamu je shrnuto to základní a společné:

- (1) Poslední velké jídlo (hmotnost 250 – 350 g) by mělo být konzumováno nejméně 3 až 5 hodin před začátkem pohybové aktivity (Vilikus 2012).

- (2) Cca 3 až 1 hodinu před sportovní aktivitou je možno konzumovat lehčí nízkotučné jídlo, založené především na sacharidové bázi (Osten 2005).
- (3) Je potřeba dodržovat pitný režim – sacharidy (glukóza) se vstřebávají nejlépe z 5%ního roztoku – doporučený příjem tekutin denně je 20-40 mL/kg daného jedince (Čeledová a Čevela 2010).
- (4) Z hlediska omezení vzniku stresové reakce a s ní související emoční nestabilitou a celkovou nepohodou spouštěné prázdným žaludkem je nutné před začátkem i během sportovního výkonu průběžně doplňovat především sacharidy v potravě (Maughan a Burke 2006; Osten 2005).
- (5) Hladinu glykemie je někdy výhodné během sportovního výkonu udržovat doplňováním přísunem sacharidů. Jedinec má totiž ve svalech běžnou zásobu glykogenu cca na několik desítek minut svalové práce (Voet a Voet 2011), jeho další potřeba je kryta z jeho zásob v játrech (zásoba činí cca 24 hodin pro bazální metabolismus).
- a. Pokud je trénink kratší než 60 min, není třeba cukry během tréninku doplňovat vůbec (Clark 2014b), pouze stačí doplňovat tekutiny.
 - b. Pokud je trénink cca do 2 hodin, lze přísun cukrů zajišťovat pomocí nápojů či gelů (Vilikus 2012).
 - c. Pro pohybovou aktivitu delší než 2 hodiny se doporučuje využít na udržení glykemie tuhá strava (Mandelová a Hrnčířiková 2007), např. vhodné je ovoce, hroznový cukr (Osten 2005).
- (6) Po tréninku je důležité tělo co nejrychleji a nejúčinněji zregenerovat.
- a. Po fyzické aktivitě krev zůstává spíše ve svalech, proto se doporučuje přijmout potravu až po 30 minutách, kdy dojde k její dostatečné redistribuci (Vilikus 2012). Tato „potréninková strava“ by měla být bohatá především na sacharidy s částečným podílem bílkovin (Al-Masri a Bartlett 2011).
 - b. K celkové regeneraci významným dílem přispívá rehydratace organismu (Novotná *et al.* 2006), protože během sportovních výkonů dochází k výrazným ztrátám

vody. I u pohybově inaktivního jedince (cca 70 kg) při optimální teplotě prostředí (22°C) je denní ztráta vody cca 2,3 litru (Provazník 1998).

V následujících podkapitolách jsou uvedena jednotlivá specifika hlavních živin (cukry, tuky a bílkoviny) s ohledem na jejich biochemický význam a využití pro sportovní výživu.

1.2 Sportovní výživa a její obecná specifika

Výživové složky můžeme rozdělit na makronutrienty a mikronutrienty. Mezi makronutrienty patří cukry, tuky a bílkoviny a mezi mikronutrienty vitamíny, stopové prvky a další. Také do sportovní výživy musíme zařadit dodržování pitného režimu.

Spotřeba makronutrientů je pro jednotlivá sportovní odvětví různá, přičemž některé obecné zásady zůstávají stejné. Platí, že nejvíce by měly být zastoupeny cukry, následovány tuky a bílkovinami (**tab. 1**).

Tab. 1. Optimální zastoupení makronutrientů ve stravě pro sportovce (Konopka 2004)

Typ tréninku/složka potravy	Vytrvalostní (%)	Silový (%)
Cukry	55-60	45-55
Tuky	25-30	30-35
Bílkoviny	12-15	15-20

1.2.1 Sacharidy

Význam sacharidů ve sportovní výživě spočívá především v tom, že se jedná o makroživiny sloužící jako jeden z primárních zdrojů energie. Hned po spotřebování ATP ve svalu přichází na řadu jako zdroj glukóza a dále glykogen (glykolýzou). Glykogen je zásobní sacharid živočichů, představuje sacharidovou makromolekulu skládající se z D-glukózy, jakožto hlavní monomerní jednotky. Největší zásoba glykogenu je v jaterních buňkách (pokrývá denní spotřebu pro bazální metabolismus) a svalech.

Kvalita sportovního výkonu rapidně klesá, pokud se hladina svalového glykogenu sníží. Za kritickou hranici je považováno 20% původní hodnoty (Fořt 2002). Důsledkem vyčerpání

zásob cukrů je snížení glykémie vedoucí až k hypoglykémii, která je provázena svalovou ochablostí, pocitu únavy a vyčerpání, objeví se studený pot a podráždění (Fořt 2004).

Na sacharidy bohatá strava je navrhována pro většinu sportů, kde je potřeba vydat okamžitý i dlouhodobý výkon (Clark 2014b). Důležité je však zdůraznit, že sportovní výkon potřebuje nejen „palivo“, ale je často výhodné používat kombinaci různých sacharidů (jejich zastoupení se liší podle původní cereálie), či potravin bohatých na sacharidy (brambory). V souvislosti s tím se rozlišují tzv. pomalé cukry, kterými jsou myšleny pomalu odbouratelné sacharidy, a tzv. rychlé cukry, tj. sacharidy, které jsou metabolizovány ze všech složek potravy nejrychleji. Mezi rychlé cukry řadíme především monosacharidy obsažené v ovoci, ale také škrob obsažený v bramborách, či v pšenici (i jiných obilovinách). Z chemického hlediska je škrob složen z polymerů amylozy a amylopektinu, je tedy polymerem skládajícím se z molekul glukózy vázaných mezi sebou O-glykosidickou vazbou.

V ideálním případě by měl být jídelníček sportovce složen z více druhů cereálií, aby byl zajištěn kontinuální přísun sacharidů během sportovní přípravy i během sportovního výkonu.

Sacharidy jsou považovány za jeden z prvních zdrojů energie pro svalovou práci. Pokud je dostupnost sacharidů během prodlouženého cvičení snížena, dostaví se únava. Proto je doporučováno před anebo i během cvičení doplňovat sacharidy, a to nejčastěji ve formě cukrů jednoduchých (glukóza, fruktóza) v nápojích nebo ovoci, případně ve formě na sacharidy bohatého objemově menšího jídla složeného převážně z cereálií a ovoce.

Sacharidy můžeme také dělit podle toho, jak jsou schopny měnit tzv. glykemický index. Glykemický index souvisí s koncentrací glukózy v krvi a se stimulací produkce inzulínu (Jenkins *et al.* 1981). Sacharidy (nebo potraviny tyto sacharidy obsahující) s vysokým glykemickým indexem (tzv. rychlé cukry) zvyšují produkci inzulínu a následně zvyšují využití glukózy během svalové práce (Guezennec *et al.* 1993). Naopak sacharidy (potraviny tyto sacharidy obsahující) s nízkým glykemickým indexem (tzv. pomalé cukry) snižují využití glukózy, navozují stav euglykémie a podporují využití lipidů (Guezennec 1995). Jediným sacharidem, který může být ve svalu použit jako zdroj energie, je glukóza. Ostatní sacharidy (jiné monosacharidy než glukóza, oligosacharidy, polysacharidy, či složené cukry) musí být metabolizovány na glukózu v játrech. V játrech je také zásoba glukózy ve formě glykogenu, která je u zdravého jedince schopna pokrýt energetické nároky bazálního metabolismu na 24 hodin.

Během cvičení (svalové práce) tedy dochází k oxidaci glukózy s rychlostí přibližně 0,4 až 1 g/min (podle typu a náročnosti cvičení). Pokud se zaměříme na to, jak optimalizovat oxidaci glukózy během cvičení, je třeba se zaměřit na úlohu inzulínu, glukagonu, adrenalinu, kortizolu a růstového hormonu. Hlavním zdrojem glukózy během prodlouženého cvičení je glukóza v krvi a glykogen ve svalu (Felig a Wahren 1975). V tomto ohledu jistě hraje svou roli genetická predispozice vytvářet dostatečnou zásobu glukózy pro např. maratonský běh i vytrvalostní trénink. Toto tedy znamená, že podáním vhodných sacharidů před nebo během prodlouženého cvičení lze oddálit nástup vyčerpání. Pomocí perkutánní svalové biopsie bylo zjištěno, že svalová únava je způsobena právě snížením (vyčerpáním) zásob glykogenu ve svalu. Pokud se koncentrace glykogenu zvedne již před tréninkem, umožní to sportovcům jak prodloužit cvičení, tak i zvednout jeho intenzitu (Bosch *et al.* 1993). Obecně příjem sacharidů během prodlouženého cvičení zachovává svalový glykogen (Elsayed *et al.* 1995; MacLaren *et al.* 1994), což vede k oddálení únavy. Experimentálně je možné studovat utilizaci substrátu pomocí poměru respirační výměny (RER). Hodnoty RER v rozmezí 0,9 až 1,0 ukazují na velmi intenzivní cvičení nebo na případ, kdy byl glykogen podán před cvičením. Další možností je určit stupeň oxidace sacharidů značenou glukózou pomocí ^{13}C nebo ^{14}C . V případě použití radioaktivně značené glukózy jsou získané výsledky v případě ^{13}C nadhodnocené a v případě ^{14}C lehce podhodnocené (Peronnet *et al.* 1990). Koncentrace glukózy v krvi během prodlouženého cvičení je doplňována z hydrolýzy jaterního glykogenu a glukoneogeneze. Glukoneogeneze je zajišťována z kyseliny mléčné, aminokyselin a alaninu.

Zajímavý je vztah okamžité utilizace energie z přijatých sacharidů ve vztahu k osmolaritě roztoku, v němž jsou sacharidy přítomny v žaludku (Vist a Maughan 1994). Obecně platí, že roztoky s nižší osmolaritou (tedy s živinově nižším obsahem energie) jsou z žaludku vstřebány rychleji, než ty živinově bohatší (s vyšší osmolaritou). Např. roztok obsahující 2,5 g/100 mL sacharidů se vstřebával ze žaludku nižší rychlostí než samotná voda (Foster *et al.* 1980). Na druhé straně množství vstřebených sacharidů z tenkého střeva a jejich oxidace stoupají lineárně s koncentrací sacharidů v žaludku (Vist a Maughan 1994).

Experimenty v tomto pohledu přinášejí zajímavé, někdy si protiřečící výsledky, např. pouze nízkokalorické nebo izokalorické roztoky sacharidů mohou být vstřebávány během prodlouženého cvičení (Foster *et al.* 1980), což je jistě důvodem k zamyšlení, jakou zvolit koncentraci sacharidů do iontových nápojů podávaných během cvičení (např. během

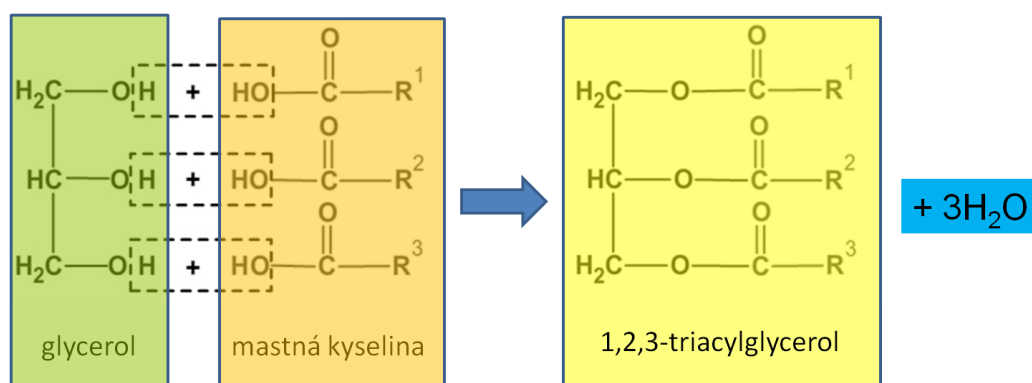
maratonu). V případě silových cvičení je naopak výhodnější pro příjem glukózy použít koncentrovanější roztoky (Vist a Maughan 1994). Některé práce tedy potvrzují, že se zvyšující se osmolaritou se rychlost vyprazdňování žaludku snižuje (Gisolfi *et al.* 1992; Vist a Maughan 1994). Jiné práce žádnou souvislost s osmolaritou roztoku sacharidů a rychlostí gastrického vyprazdňování nenacházejí (Murray *et al.* 1994). Důvodem může být i nedostatečný popis a pochopení mechanismů působících při vstřebávání sacharidů, ale také různý metodický přístup experimentů. Např. Foster *et al.* (1980) ukázali, že 5% roztok škrobu (polymeru glukózy) se vstřebává o 30 % rychleji než 5% roztok glukózy jako monosacharidu, přičemž ale v této studii vůbec není brán v potaz celkový objem tekutiny v žaludku. K podobnému závěru došli i Moodley *et al.* (1992) a Leese *et al.* (1995), kteří zkoumali rychlost gastrického vyprazdňování roztoku směsi polymeru glukózy a sacharózy v porovnání s volnou glukózou. Shodně zjistili, že rychlost vstřebávání polymerní glukózy a sacharózy je vyšší než u volné glukózy. Podobné závěry vycházejí i ze srovnání roztoku glukózy a maltodextrózy, která se vstřebává pomaleji než roztok sacharózy (případně směsný roztok sacharózy s glukózou) (Murray *et al.* 1994). Důvod, proč se roztoky polysacharidů vstřebávají rychleji než roztoky monosacharidů, souvisí právě s jejich osmolaritou; roztok polysacharidu o stejné výsledné koncentraci monomerních jednotek má nižší osmolaritu než stejně koncentrovaný roztok monomerních sacharidů (MacLaren *et al.* 1996). Zajímavé jsou i závěry studií rychlosti sorpce různých sacharidů ze střeva. Samotná fruktóza je ze střeva vstřebávána pomaleji než např. glukóza nebo sacharóza, ale v případě, že je fruktóza ve střevě přítomna nikoli samostatně, ale v přítomnosti dalších sacharidů (glukózy, sacharózy), je její vstřebávání naopak rychlejší než u samotné glukózy (Murray *et al.* 1989). Z tohoto úhlu pohledu je jasné, že vstřebávání sacharidů rozhodně není triviální problém a je nutné jej studovat mimo jiné jako koktejlový efekt různých sacharidů a v interakci se specifickými přenašeči. Je obecně známo, že např. glukóza je z tenkého střeva transportována aktivním symportem současně s kationtem sodíku, za spotřeby 30 kJ mol^{-1} (což odpovídá hydrolýze ATP na ADP).

1.2.2 Lipidy

Pokud v těle dojdou zásoby cukrů na pokrytí energetických výdajů, dochází k hydrolýze tuků a následné beta-oxidaci mastných kyselin. Jedná se původně o energeticky náročný proces probíhající v mitochondriích. Samotný čistý zisk z metabolismu tuků je však vyšší než

u ekvivalentního množství cukrů. Např. z jednoho gramu tuku lze oxidací získat cca 36 kJ, což je cca dvojnásobek energetického zisku z 1 g glukózy (Brown *et al.* 2014). Řada autorů (Clark 2014b; Konopka 2004) doporučuje, aby z energetického hlediska příjem tuků kryl cca 1/3 celkové energetické spotřeby.

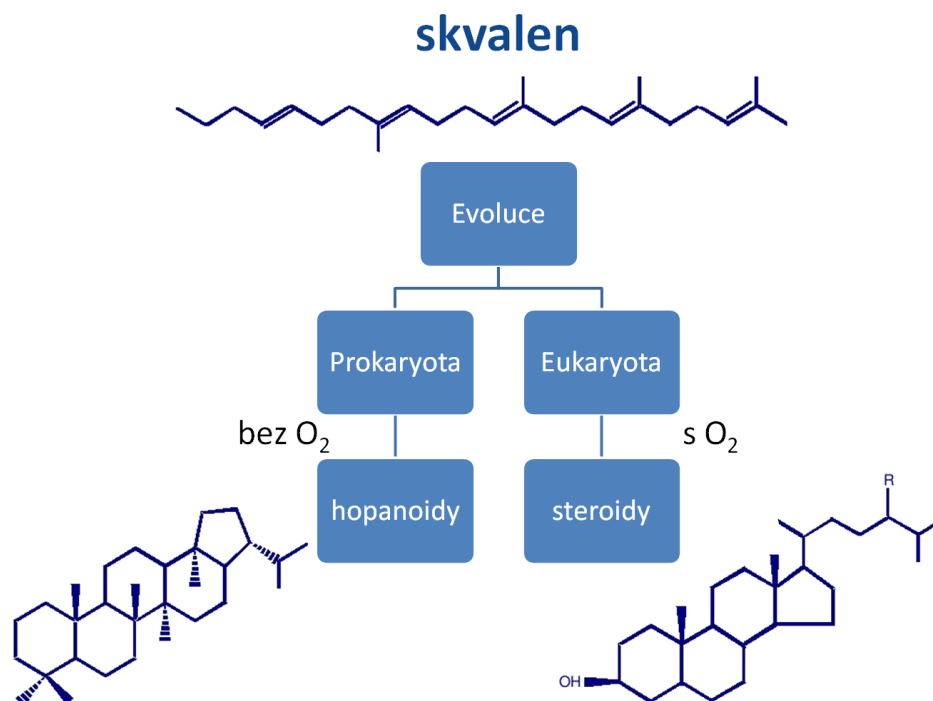
Tuky jsou nejen hlavním zdrojem zásobní energie, ale také tvoří cca 98 % struktury biologických membrán (2/3 fosfolipidy, 1/3 cholesterol), jsou též nedílnou součástí mozkových struktur (sfingolipidy) a tvoří velkou část tzv. Schwannových buněk (buňky obalující nervová vlákna v pravidelných úsecích, čímž urychlují přenos nervového vzruchu). Mezi lipidy patří jednoduché lipidy, lipidy složené a lipidy odvozené. Jednoduché lipidy (triacylglyceroly; TAG) jsou produkty esterifikace mastných kyselin a glycerolu (**obr. 2**).



Obr. 2. Esterifikace, reakce, při které obecně vznikají jednoduché lipidy (triacylglyceroly) (úprava: autorka)

Podle toho, zda mastná kyselina obsahuje dvojnou vazbu, je rozdělujeme na nasycené (neobsahují dvojnou vazbu, patří sem zejména tuky živočišné) a nenasycené (obsahují alespoň jednu dvojnou vazbu, patří sem tuky převážně rostlinné). V rámci nich ještě rozlišujeme polynenasycené mastné kyseliny, nejčastěji tzv. omega 3, 6 a 9 mastné kyseliny. Jejich příjem v optimálním poměru má pomáhat předcházet kardiovaskulárním chorobám (Alexander *et al.* 2017) a dokonce depresím (McNamara 2016). Mezi významné složené lipidy patří např. fosfolipidy (kromě lipidické části obsahují zbytek kyseliny fosforečné), sfingolipidy (obsahují navíc cukernou část) a lipoproteiny (regulační funkce v příjmu tuků).

Odvozené lipidy obsahují jako základní strukturní jednotku izopren a jejich evoluce se odvozuje od skvalenu (**obr. 3**), kdy působením UV záření (a enzymů viz. dále) za přítomnosti kyslíku došlo k biosyntéze základní steroidní struktury.



Obr. 3. Zjednodušené schéma vzniku steroidů a hopanoidů z triterpenu skvalenu (úprava: autorka).

Odvozené lipidy mají v těle především regulační a řídicí a strukturní funkce, protože mezi ně patří vitamíny (D, K, A), koenzymy (Q10), pohlavní hormony (androgeny i estrogeny), ale také např. cholesterol.

Z hlediska příjmu tuků v potravě je třeba rozpoznat význam jednotlivých typů tuků pro patřičné procesy. Příjem tuků a jejich jednotlivé zastoupení v potravě může velmi ovlivnit průběh sportovního výkonu a jeho výsledek. Nicméně je nutno podotknout, že díky nedostatečným znalostem některých autorů učebnic zabývajících se sportovní výživou týkající struktury a vlastnosti tuků, se do literatury určené sportovcům dostává poměrně mnoho nepřesných informací, zavádějících tvrzení a dokonce i chybných interpretací.

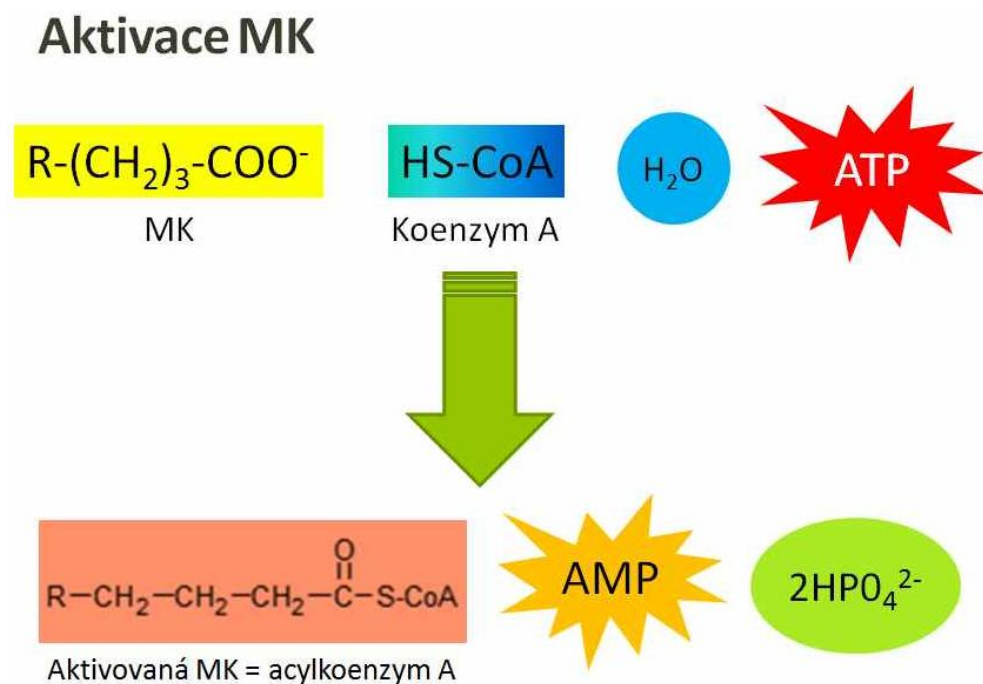
Pravdou je, že nasycené tuky (TAG nasycených mastných kyselin) jsou pro lidský organismus hlavní zásobárnou energie, která se nachází v buňkách zvaných adipocity. degradace TAG probíhá tak, že nejprve dojde k jejich hydrolýze za účasti enzymů lipáz

v tenkém střevě nebo ve slinivce břišní (**obr. 4**), což je reakce opačná k esterifikaci (**obr. 2**). Vzniklý glycerol se pak rozkládá podobně jako cukry, tedy glykolýzou. Odbourávání TAG v rámci buňky probíhá v cytoplasmě.



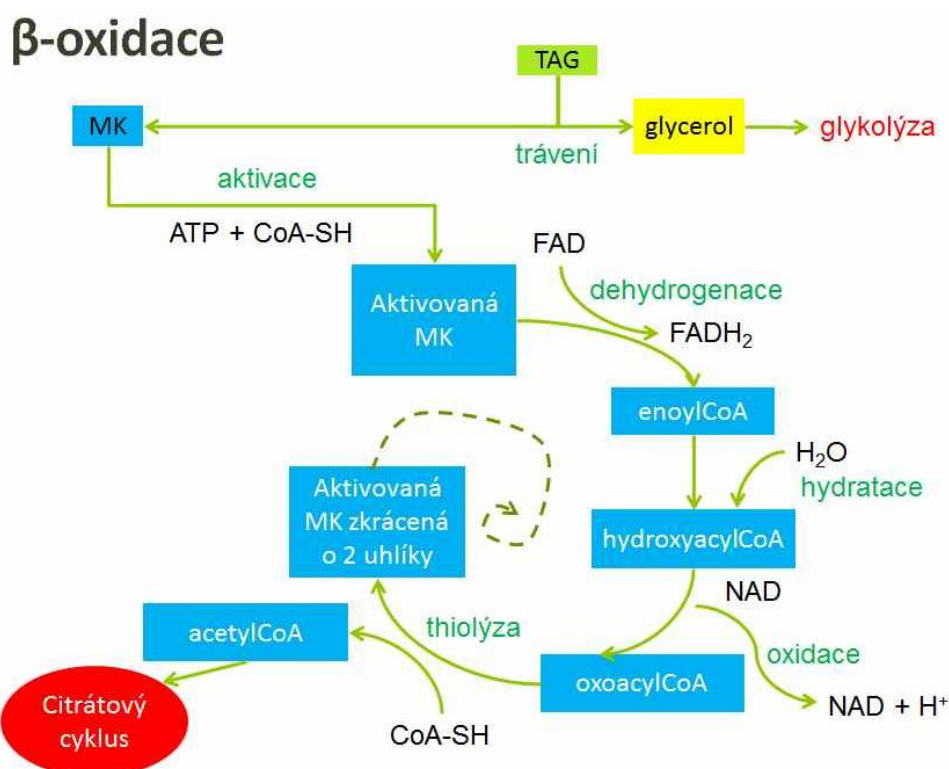
Obr. 4. Odbourávání jednoduchých lipidů – triacylglycerolů (TAG) na volné mastné kyseliny (MK) a glycerol (úprava: autorka).

Vzniklé mastné kyseliny (MK) jsou v těle rozkládány procesem β -oxidace, která probíhá v mitochondriích. MK je před vstupem do katabolického procesu třeba aktivovat navázáním na koenzym A za současné spotřeby ATP – vzniká AMP, nebo 2 ATP – vznikají 2 ADP (**obr. 5**). Vzniklý acyl-koenzym A (tj. aktivovaná MK) je následně degradován sérií reakcí (**obr. 6**) po dvojuhlíkatých „štěpech“ směrem od karboxylového konce MK. Výsledným produktem je pak acetyl-koenzym A, který vstupuje do citrátového (Krebsova) cyklu.



Obr. 5. Aktivace MK (mastných kyselin) probíhající navázáním na koenzym A za současné spotřeby dvou makroergických vazeb ATP a molekuly vody (úprava: autorka).

Během odtrhávání dvojuhlíkatého „štěpu“ (předchůdce acetylkoenzym A) také vznikají redukované formy flavinadeninindinukleotidu (FAD, vzniká FADH₂) a nikotinamid-adeninindinukleotidu (NAD, vzniká NAD+H⁺). Tedy produktem není přímo ATP, jak je někdy zjednodušováno. ATP je pak produktem oxidační fosforylace za účasti membránových komplexů v mitochondriích, jíž se obě redukované formy FADH₂ a NAD+H⁺ účastní a jsou spotřebovávány.

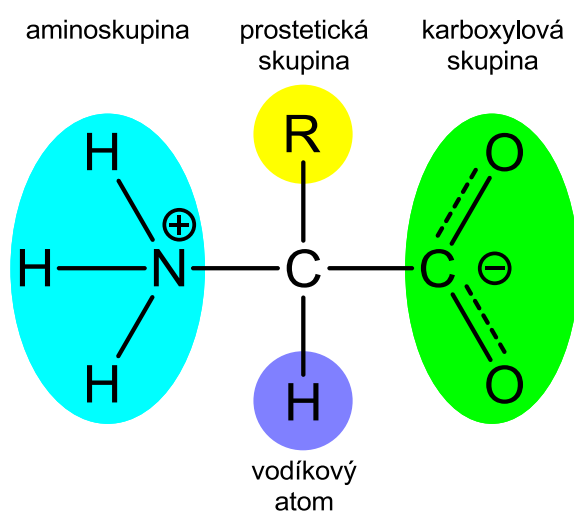


Obr. 6. Zjednodušené schéma β -oxidace mastných kyselin (MK) (úprava: autorka).

1.2.3 Bílkoviny

Bílkoviny nejsou primárním zdrojem energie. Mezi jejich hlavní funkce patří především funkce stavební, regulační (řídící), transportní, skladovací, pohyb zajišťující, katalytické, obranné a ochranné (Brown *et al.* 2014; Fořt 2002). Bílkoviny se skládají z dvaceti kódovaných aminokyselin (**obr. 7**) a jejich primární struktura (pořadí za sebou jdoucích aminokyselin) spojených peptidickou vazbou je zapsána (kódována) v nukleových kyselinách. V těle vznikají vždy *de novo* procesem nazývaným proteosyntéza. Jedná se o makromolekulární látky často s velmi velkou molekulovou hmotností. Rozlišujeme bílkoviny

jednoduché (skládají se pouze z aminokyselin) a složené (kromě aminokyselin obsahují též tzv. nebílkovinnou část; často sacharid, lipid, esenciální kov atd.). Podle terciární struktury je též můžeme dělit na globulární nebo fibrilární. Nalezneme je jako základ struktury svalů (např. myoglobin, aktin, myosin), ale i kostí (např. kostní morfogenetický protein); patří sem většina enzymů (např. pepsin, amyláza atd.), některé hormony (např. inzulin, glukagon), dále integrální membránové proteiny (mají význam v mezibuněčné komunikaci), membránové kanály (slouží k průchodu konkrétních látek, či udržování jejich gradientu).



Obr. 7. Obecná struktura aminokyselin (úprava: autorka).

Bílkoviny přítomné v těle se postupně obnovují; záleží na jejich intenzitě použití, jak často je třeba je resyntetizovat. Např. svalový myoglobin má průměrnou dobu života 180 dní, inzulin 3 dny. Z tohoto důvodu je nutné zdrojové bílkoviny (aminokyseliny) tělu dodávat v potravě. Cca 2/3 množství bílkovin jsou průběžně recyklovány, zbylá 1/3 musí být kryta potravou (Mandelová a Hrnčířiková 2007).

Degradace bílkovin v těle zahrnuje primárně denaturaci bílkovin spojenou s přerušением vodíkových vazeb (kvartérního, terciární a sekundárního uspořádání) a také s částečnou hydrolyzou pepsinem. Dále je jejich degradace spojena s degradací peptidové vazby v rámci primární struktury. Peptidová vazba je degradována enzymy peptidázami. Rozlišujeme endo- a exopeptidázy, podle toho, zda odštěpují aminokyseliny ze střední části nebo z krajů polypeptidového řetězce, případně rozlišujeme karboxypeptidázy (degradují polypeptidový

řetězec ze strany karboxylové skupiny) a aminopeptidázy (degradují polypeptidový řetězec od aminoskupiny). Výsledkem degradace jsou jednotlivé aminokyseliny. Následně dochází k deaminaci aminokyseliny a detoxikaci vzniklého amoniaku jeho přeměnou na močovinu v močovinovém cyklu. Deaminovaná kyselina je dále degradována podobně jako cukry a tuky, přičemž metabolické přeměny jednotlivých aminokyselin jsou velmi individualizované; platí, že jednotlivé metabolity aminokyselin vstupují do Krebsova cyklu v jeho různých fázích. Např. arginin, histidin, glycin a prolin vstupují přes 2-oxoglutarát; valin, methionin a threonin vstupují přes sukcinyl-CoA, atd.

Spotřeba bílkovin se u různých sportů liší (Clark 2014b), přičemž jejich optimální dávka v potravě závisí jak na hmotnosti, tak na pohlaví a celkové zdravotní kondici jedince. **Tabulka 2** udává orientační doporučenou dávku v gramech na kilogram tělesné hmotnosti.

Tab. 2. Doporučená denní dávka bílkovin na 1 kg tělesné hmotnosti (podle Clark (2014b)).

	typ aktivity	doporučená dávka (g/kg)
dospělý	sedavý způsob	0,8
dospělý	kondiční cvičení	1,0-1,5
dospělý	Vytrvalostní	1,2-1,6
dospívající	sportovec v růstu	1,5-2,0
dospělý	budující svalovou hmotu	1,5-1,7
dospělý	sportující, omezující příjem energie	1,6-2,0

1.2.4 Voda

Už samotný fakt, že lidské tělo se skládá z 60% (u dospělého jedince) z vody, ukazuje na důležitost vody pro většinu biochemických procesů, s čímž úzce souvisí dodržování pitného režimu nejen u sportovců.

Voda byla prapůvodní prostředí, kde pravděpodobně před čtyřmi miliardami let vznikl první život tak, jak jej známe. Voda poskytovala pro organismy primární ochranu před UV-zářením a zároveň vytvářela (a stále vytváří) vhodné reakční medium. Voda je zároveň velmi dobrým rozpouštědlem pro všechny polární látky. Díky přítomnosti vodíkových vazeb je při

běžném atmosférickém tlaku a běžných teplotách kapalná. Molekuly vody mají tendenci díky vodíkovým můstkům držet při sobě (koheze) a zároveň smáčet povrchy (adheze). Tekutiny obsažené v lidském těle můžeme rozdělit na tekutiny (i) intracelulární (v buňkách), (ii) extracelulární (mimobuněčná tekutina) a (iii) vaskulární a lymfatické (krev a lymfa). Není náhodou, že iontové složení intracelulárních tekutin je velmi podobné složení mořské vody.

Na dodržování pitného režimu je kladen dostatečný důraz teprve od 70. let 20. století (Vilikus 2012). V případě, že přísun tekutin není dostatečný, dochází často k bolestem hlavy, zácpě, zhoršení psychické koncentrace a poklesu fyzického výkonu (Vilikus 2012). Dodržování pitného režimu znamená vyrovnat přísunem tekutin jejich ztráty, a to ideálně kontinuálně. U dospělého jedince činí doporučená denní dávka 20-40 mL na kg hmotnosti (Čeledová a Čevela 2010). U sportovců (během pohybových aktivit) je však spotřeba vody vyšší, proto je třeba konzumaci vody navýšit dle aktuální potřeby. Výpar vody pokožkou těla má termoregulační funkci, protože během fyzické aktivity dochází k ohřívání tkání (Clark 2014b).

Lidské tělo zcela přirozeně v důsledku metabolismu (i bazálního), pohybových aktivit a termoregulace vodu ztrácí (**tab. 3**). Cílem pitného režimu je právě tyto ztráty kompenzovat (Novotná *et al.* 2006). Velikost ztrát tělesných tekutin samozřejmě závisí na vnější atmosférické teplotě a vlhkosti, nadmořské výšce, druhu pohybové (ale i psychické) aktivity, pohlaví, věku, ploše těla, obsahu tuku a svalové hmoty v těle a tělesné zdatnosti (Vilikus 2012). Ztráty tělesných tekutin jsou velmi individualizované, nicméně z tabulky je vidět, že během fyzické aktivity mohou dosahovat poměrně vysokých hodnot, i více než 6 litrů.

Tab. 3. Ztráty tělesných tekutin jednotlivými orgány za den (Provazník 1998)

orgán	ztráty tekutin mL/den		
	normální teplota	horké počasí	při delší fyzické „práci“
Kůže	350	350	350
Dýchání	350	250	650
Moč	1400	1200	500
Pot	100	1400	5000
Stolice	100	100	100
<i>Celkem</i>	<i>2300</i>	<i>3300</i>	<i>6600</i>

Změny v obsahu vody v těle souvisí též s osmotickou rovnováhou danou vzájemným poměrem hlavních intra- (K^+) a extracelulárních (Na^+ , Cl^-) elektrolytů. Pokud obsah vody klesne o 5% pod normální stav, dochází k hypervolémii (Neumann 2001).

Na druhé straně nadměrný přísun tekutin během pohybové aktivity může způsobit gastrointestinální problémy, jako je například nadýmání, plynatost, bolest břicha, plnost žaludku, nevolnost, zvracení, průjem, pálení žáhy, střevní křeče a gastrointestinální krvácení (Daries 2012).

V posuzování dostatečného příjmu tekutin (hydratace) je možno se kromě pocitu žízně (který např. u dětí a starších jedinců není dostatečný) orientovat např. na základě barvy moči; čím je moč tmavší, tím více je třeba navýšit konzumaci tekutin.

1.3 Minerální látky, vitamíny a potravinové suplementy

Tyto látky můžeme též zařadit mezi tzv. biologicky aktivní látky (viz dále), protože navzdory jejich nízké přítomné koncentraci významně ovlivňují biochemické pochody. Mezi nimi se nacházejí potenciální kandidáti pro studium jejich koktejlových interakcí *ex situ* pomocí autorkou představovaného instrumentálního přístupu (viz dále).

1.3.1 Minerální látky

Mezi minerální látky se řadí především prvky (anionty či kationty), např. sodík (jako Na^+), chlór (jako Cl^-), nebo tyto prvky obsahující funkční skupiny, např. fosfor (jako PO_4^{2-}). Termínem „minerální“ se označují proto, že po mineralizaci (tj. úplném spálení těl živých organismů, tedy rozkladu organických látek) tyto látky zůstávají nejčastěji ve formě iontů, solí nebo oxidů. Jejich přítomnost v mnohých biochemických dějích je nezbytná, zejména z hlediska správného metabolismu, enzymatické aktivity mnohých enzymů (tyto látky jsou často nezbytnými kofaktory), udržení homeostázy organismu, udržení klidového membránového potenciálu buněk (i jeho depolarizace) a dalších dějů. **Tab. 4** udává stručný přehled významu některých významných minerálních látek.

Tab. 4. Shrnutí funkcí nejdůležitějších minerálních látek (upraveno a doplněno dle Skolnik a Chernus (2011)).

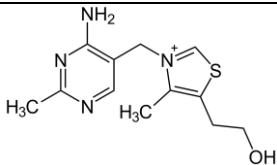
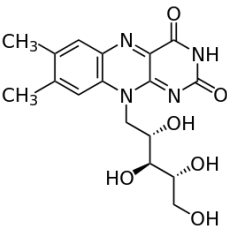
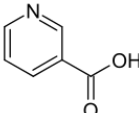
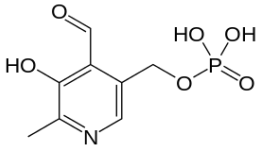
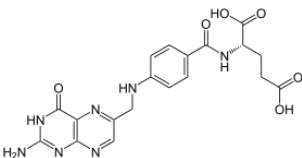
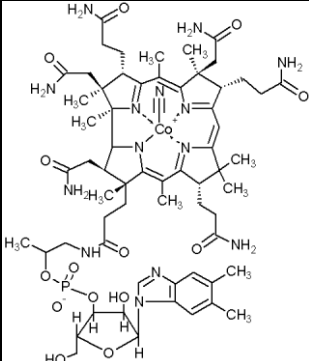
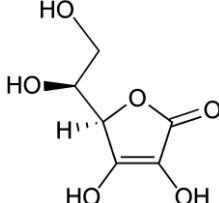
Prvek	Aktivní forma	Vybrané funkce
Sodík	Na ⁺	Polarizace, depolarizace biologických membrán
Chlór	Cl ⁻	Aktivátor pepsinu, polarizace, depolarizace biologickým membrán
Draslík	K ⁺	Spoluvytváří membránový potenciál
Vápník	Ca ²⁺	Svalová kontrakce, stavba kostní tkáně
Fosfor	PO ₄ ²⁻	Součást struktury nukleových kyselin, makroergických látek, součást kostní tkáně
Hořčík	Mg ²⁺	Svalová kontrakce, podpora mineralizace kostí, přenos nervových vzruchů, součást některých enzymů, účast při proteosyntéze
Železo	Fe ²⁺	Součást hemoglobinu, správná funkce štítné žlázy
Zinek	Zn ²⁺	Součást funkčních částí enzymů, účast na transkripci i translaci, účast na transportu vitamínu A, hojení ran, správný vývoj plodu, produkce spermatu, správná funkce štítné žlázy
Selen	SeO ₃ ²⁻	Antioxidant, správná funkce štítné žlázy
Jód	I ⁻	Součást hormonů štítné žlázy podílejících se na regulaci metabolismu
Měď	Cu ²⁺ , Cu ⁺	Pro vstřebávání Fe a syntézu hemoglobinu, součást některých enzymů (např. ceruloplasmin)
Mangan	Mn ²⁺ , Mn ⁷⁺	Oxidačně-redukční procesy
Fluor	F ⁻	Tvorba kostí a zubů
Chrom	Cr ³⁺	Podpora funkce inzulínu

1.3.2 Vitamíny

Vitamíny jsou podobně jako minerální látky nezbytné pro správný chod biochemických reakcí, a též se tedy řadí mezi biologicky aktivní látky. Jedná se o látky organické. Některé si lidský organismus dokáže sám (nebo s pomocí symbiotických bakterií žijících v trávicím traktu) vyrobit *de novo* nebo z prekurzorů (provitamínů), anebo je nezbytné jejich příjem zajistit v potravě (nebo suplementech). Někdy si tělo vitamín sice dokáže samo syntetizovat, nicméně ne v dostatečném množství. Např. vitamín D si tělo dokáže samo syntetizovat pouze v případě, že je dostatečně exponováno slunečnímu záření. Od čehož se odvíjí nejen jejich

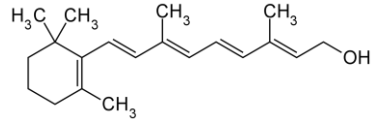
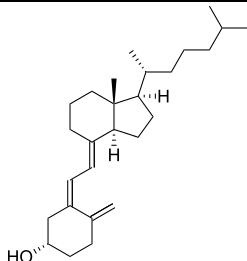
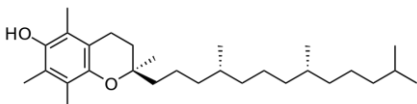
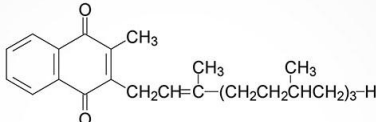
přijatelnost, ale také kumulace v organismu. Obecně můžeme vitamíny rozdělit podle jejich schopnosti se ve vodě rozpouštět (B, C, **tab. 5**) nebo nerozpouštět (A, D, E, K, **tab. 6**).

Tab. 5. Přehled a hlavní funkce ve vodě rozpustných vitamínů (upraveno a doplněno dle Misra (2017))

Název	Vzorec	Funkce a nedostatek
B ₁ thiamin		Podpora nervových funkcí a aktivit, podpora energetického metabolismu. Při nedostatku svalové křeče, ztráta chuti k jídlu.
B ₂ riboflavin		Podpora metabolismu, nervové soustavy, trávicí soustavy, stav kůže. Při nedostatku afty, popraskaná kůže na obličeji, horší vidění za šera.
B ₃ niacin		Podpora metabolismu, nervové soustavy a zdravé kůže. Při nedostatku dermatitidy, deprese i demence.
B ₆ pyridoxin		Vliv na metabolismus aminokyselin a mastných kyselin, tvorba červených krvinek. Při nedostatku anemie, podrážděnost, senzitivní a iritabilní pokožka, možné červené skvrny.
Kyselina listová		Souvisí s duplikací buněk a buněčnou mitózou. Při nedostatku narušené buněčné dělení, anemie, gastrointestinální problémy.
B ₁₂ kobalamin		Souvisí s proteosyntézou, štěpením mastných kyselin a aminokyselin. Podílí se na ochraně neuronů. Jeho nedostatek není častý.
C kyselina askorbová		Působí v syntéze kolagenu, metabolismu aminokyselin. Pomáhá vstřebávat železo z potravy. Podporuje imunitu a působí jako antioxidant. Při nedostatku kurděje, svalová slabost, snadná tvorba podlitin.

Mírně zvýšena potřeba u sportovců je zejména u thiaminu (B_1) v důsledku zvýšené fyzické aktivity (Choi *et al.* 2013; Manore 2000). U pohybově aktivních žen dodržujících zároveň redukční dietu byla pozorována o 30-65% navýšená spotřeba riboflavinu (B_2) v porovnání s běžnou dospělou populací (Manore 2000). Naopak úloha niacinu (B_3) ve sportovní výživě je poněkud sporná, protože zvýšený příjem niacinu může mít vliv na metabolismus tuků blokováním uvolňování volných mastných kyselin z tukové tkáně a na zvýšení závislosti na využití sacharidů, což může vést k předčasnému vyčerpání svalového glykogenu. Některé výzkumy ukázaly, že přebytek niacinu v doplňcích může ve skutečnosti zhoršit aerobní vytrvalostní výkon (Williams 2004), a to v důsledku toho, že snižuje uvolňování mastných kyselin z adipocytů (Dunatchik *et al.* 2012). Zvýšená potřeba pyridoxinu (B_6) u sportovců jasně prokázána nebyla, některé studie sice uvádějí zvýšení výkonnosti, jiné ne (Kreider *et al.* 2010). Nejednoznačnost výzkumných dat je možná dána tím, že koncentrace B_6 byla zjišťována ve vzorcích krevní plazmy, přičemž tělesné zásoby B_6 se nacházejí ve svalech, což v podstatě znemožňuje jeho obsah sledovat u lidských jedinců. Zatím nebylo prokázáno, že by fyzická aktivita zvyšovala spotřebu kobalaminu (B_{12}) (Herrmann *et al.* 2005)), na druhé straně je známo, že jeho nadměrný příjem vede k megaloblastické anemii (nemoc charakteristická velkými dysfunkčními erytrocyty), která zhoršuje fyzický a psychický výkon a zvyšuje nástup únavy. V případě, že je B_{12} deficitní, projeví se nedostatkem energie a zvýšenou únavou (Solomon 2015). Je tedy třeba dbát na optimální přísun B_{12} . Kyselina L-askorbová (vitamín C) je látka potřebná pro celou řadu životně důležitých procesů jako je tvorba kolagenu, hojení ran, absorpci iontové formy železa, produkci karnitinu, epinefrinu i celé řady jiných látek (de Quadros *et al.* 2016). Obecně je známo, že zefektivňuje imunitní reakci. Zajímavé je též využití vitamínu C jako antioxidantu, tedy látky likvidující volné radikály, které vznikají v buňce během metabolického spalování živin při nedostatku kyslíku (Gomez-Cabrera *et al.* 2008). V tomto ohledu jsou u sportovců zvýšené nároky na obsah vitamínu C opodstatněné. Nicméně pozitivní účinky vitamínu C u sportovců nejsou až tak jednoznačné, protože podle některých autorů (Gomez-Cabrera *et al.* 2008; Nikolaidis *et al.* 2012) vitamín C snižuje adaptaci na pohybovou námahu. Může působit i jako pro-oxidant (Jayasinghe *et al.* 2013; Ristow *et al.* 2009; Yen *et al.* 2002).

Tab. 6. Přehled a hlavní funkce v tučných rozpustných vitamínů (upraveno a doplněno dle Coulston (2017))

Název	Vzorec	Funkce a nedostatek
A retinol		Nutný pro ostré vidění, růst kostí, zdravou kůži. Vliv na imunitu a reprodukci. Při nedostatku ztráta chuti k jídlu, šupinkující pokožka, snížená obranyschopnost, zhoršené vidění.
D ₃ kalciferol		Nutný pro správnou a dostatečnou mineralizaci kostí. Při nedostatku osteoporóza.
E tokoferol		Antioxidant. Při nedostatku, svalová nekróza, anemie.
K ₁ fylochinon		Napomáhá syntéze proteinů podílejících se na srážení krve, regulace hladiny Ca ²⁺ v krvi. Při nedostatku, porucha koagulace.

Všechny ve vodě nerozpustné vitamíny patří do skupiny odvozených lipidů. Jsou odvozeny (podobně jako cholesterol nebo ostatní sterolové látky) od isoprenu. Původním substrátem pro biosyntézu v tučných rozpustných vitamínů je skvalen (viz **obr. 3**). Ve sportovní výživě je zejména důležitý vitamín D (kalciferol), vitamín E (tokoferol) a vitamíny ze skupiny K (K₁, K₂ a K₃).

Pro vitamín D (který je zároveň hormonem) se uplatňují dvě jeho formy – vitamín D₃ (cholecalciferol) a D₂ (ergocalciferol). Vitamín D₃ má pro sportovce význam především v souvislosti s kostním a svalovým zdravím, protože ovlivňuje absorpci Ca²⁺. Nicméně receptory pro vitamín D se nacházejí po celém těle, z toho se usuzuje na jeho daleko větší význam. Předpokládá se, že má protektivní účinky před vznikem hypertenze (Forman *et al.* 2013), cukrovky (Talaie *et al.* 2013), roztroušené sklerózy (Kimball *et al.* 2011) a fibromyalgie (Wepner *et al.* 2014).

Význam vitamínu E (tokoferolu) ve sportovní výživě tkví především v jeho schopnosti tlumit účinky volných radikálů (Williams *et al.* 2006). Jedná se o tzv. „zhášec“ volných radikálů tím, že volný nepárový elektron (zodpovědný za enormní reaktivitu radikálů) přijímá a tlumí jeho účinky. Obecněji jsou tyto látky nazývány jako antioxidanty. Vitamín E zejména chrání lipidy přítomné v buněčných membránách. Nicméně, jak je pojednáno dále, tyto schopnosti jsou relativní a velmi záleží na podmínkách prostředí. Zajímavé jsou i studie, které se pokoušejí popsat koktejlový efekt dvou současně podaných vitamínů před cvičením. Bylo zjištěno, že pozitivní efekt cvičení na citlivost inzulinových receptorů se ruší pokud jsou před cvičením současně podány vitamíny C a E (Ristow *et al.* 2009).

Obsah vitamínu K je zejména ovlivněn stavem střevní mikroflóry, protože k jeho syntéze dochází právě ve střevech za pomoci symbiotických bakterií. Střevní mikroflóru často negativně ovlivňuje nadměrný příjem sacharidů, vitamínu A a E a také užívání antibiotik (van der Beek 1991).

1.3.3 Vybrané potravinové suplementy

Produkce potravinových suplementů je odvětví s ročním obratem více jak 20 miliard US Dolarů (údaj z roku 2010). Na tyto potravinové suplementy se přesto nevztahuje stejně přísná legislativa jako na léčiva. Z toho vyplývá i problematičnost statutu potravinových suplementů. U potravinového suplementu není legislativou vyžadováno potvrzení účinnosti. Nicméně se tiše předpokládá, že nebude obsahovat nedovolené a zdraví škodlivé látky. Jak však vyplývá z živé diskuse ohledně kvality a skutečné účinnosti potravinových doplňků (Hajšlová a Bobůrková 2017), 2/3 z volně prodejných potravinových doplňků neobsahují deklarované látky (nebo obsahují jiné množství těchto látek, než je deklarováno), jsou pančované, nebo dokonce obsahují zdraví škodlivé látky. Výrobce často deklaruje výčet pozitivních účinků, které dokládá buď patentem, nebo účinností v klinické studii, nicméně vzhledem k tomu, že toto není legislativou vyžadováno a tedy ani kontrolováno, jedná se o údaj pro spotřebitele pouze orientační. Pokud suplement obsahuje konkrétní látky, je vhodné si před pořízením takového produktu zjistit informace z nezávislých zdrojů; ideálně z vědeckých studií publikovaných v řádně recenzovaných časopisech (oborově např.

Medicine and Science in Sports and Exercise, International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism, Lancet a další; širší výčet časopisů např. v databázi Web of Science).

Kreatin (kyselina methylguanidinoctová) je dnes velmi běžným suplementem, o kterém existuje celá řada publikací v renomovaných časopisech. Předpokládá se, že zvyšuje svalový výkon a rychlost a též stimuluje nárůst svalové hmoty (Buford *et al.* 2007; Harris *et al.* 1992). Kreatin je látka společná všem obratlovcům, která se především vyskytuje ve svalech a slouží k trvalejšímu uložení energie dočasně vázané energie přenosem jedné fosfátové skupiny z ATP (vzniká ADP). V případě potřeby je tato fosfátová skupina zpět navázána na ADP za vzniku ATP, který je pak přímo využit jako přenašeč energie. **Kreatin** se nejčastěji prodává ve formě prášku rozpustného ve vodě, přičemž je-li podán současně se sacharidy, tak se urychlí jeho dopravení do svalu a též se přítomností sacharidů vyplaví inzulin (Steenge *et al.* 1998). Doporučená dávka je 3-5 g/den, přičemž je doporučeno se vyhýbat v době suplementace kofeinem (Tarnopolsky 2010). Metabolitem kreatinu je kreatinin, který je vylučován ledvinami. Mezi vedlejší účinky užívání kreatinu bývá např. nevolnost, zvracení, svalové křeče, natažení svalu a průjem (Juhn a Tarnopolsky 1998).

HMB (beta-hydroxy-methylbutyrát) je látka, u níž se předpokládá, že napomáhá budování svalové hmoty, chrání před odbouráváním proteinů svalových tkání a také snižuje množství tělesného tuku (Wilson *et al.* 2008). Jak již z jeho základní charakteristiky vyplývá, jedná se o výživový doplněk především pro silové sportovce a bodybuilding. Biochemicky se jedná o metabolit aminokyseliny leucinu (Nissen *et al.* 1996). Předpokládá se, že **HMB** stabilizuje sarkolemu – plasmatickou membránu svalu (Wilson *et al.* 2008). HMB se užívá orálně ve formě tablet nebo prášku, lépe je vstřebáván, pokud se podává samostatně. Pokud je podáván společně s glukózou, vstupuje do svalových buněk pomaleji (Wilson *et al.* 2013).

Glutamin by měl působit preventivně proti poklesu imunity způsobené dlouhodobým vytrvalostním cvičením, také snižuje amonémii po vytrvalostním tréninku (Walsh *et al.* 1998). Během cvičení sice klesá hodnota glutaminu pod normální hodnotu, nicméně vědecké studie zatím jednoznačně neprokázaly pozitivní účinek glutaminu na stimulaci obranného systému. Je zde totiž jistá komplikace, a to, že se během tréninku vyplavují do krevního oběhu stresové hormony, které snižují aktivitu lymfocytů (Hoffmangoetz a Pedersen 1994). Biochemicky se jedná o aminokyselinu s rozvětveným řetězcem, patří mezi tzv. neesenciální aminokyseliny, tedy si ji lidské tělo dokáže v jisté potřebné míře syntetizovat samo.

Kofeinu je přisuzováno, že nás udržuje v bdělém stavu, čilejší a akceschopné. Také je považován za antioxidant (Astorino a Roberson 2010; Ganio *et al.* 2009). Kofein působí na celou řadu procesů, ovlivňuje centrální nervovou soustavu, srdce, či krevní tlak. Také působí na tzv. dopaminergní receptory v mozku, čímž podněcuje spouštění „příjemných pocitů“. Toto je také mechanismus, kterým vzniká na kofeinu závislost (Fredholm *et al.* 1999; Nehlig 1999). Jako suplement se většinou neužívá samostatně, ale v kombinaci, a to zejména v přípravcích pro vytrvalostní cvičení (Sinclair a Geiger 2000). U kofeinu je důležité vhodné dávkování, přičemž jako optimální dávka se udává 3 mg/kg tělesné hmotnosti. Vyšší dávky již nejsou spojovány s pozitivním účinkem a mohou vést k tachykardii (Pelchovitz a Goldberger 2011). Kofein též ovlivňuje aktivitu plasmového reninu a vede akutně ke zvýšenému tlaku (Nurminen *et al.* 1999; Palatini *et al.* 1996). Jeho aktivita souvisí též se stimulací produkce katecholaminů, což jsou hormony zvyšující tepovou frekvenci a iniciují vasokonstrikci (Nehlig a Debry 1994).

Omega-3-mastné kyseliny jsou speciální skupinou nenasycených mastných kyselin, které mají lokalizovanou dvojnou vazbu mezi 3. a 4. uhlíkem od konce polyuhlíkatého řetězce mastné kyseliny (za formání začátek je na karboxylové skupině). Předpokládá se, že potlačují vznik zánětu. Mezi zástupce omega-3-mastných kyselin patří např. kyselina alfa-linolenová (ALA), dokosahexaenová (DHA) a eikosapentaenová (EPA). Často jsou jejich triviální názvy odvozeny z řečtiny a udávají počet uhlíků v řetězci, např. eikosa znamená 20, tedy EPA obsahuje v alifatickém řetězci 20 uhlíků.

ALA se nachází zejména v na tuk bohatých rostlinných částech (vlašské ořechy, lněná semínka apod.) DHA a EPA jsou zase bohatě zastoupeny především v tučných mořských rybách (losos, makrela, sled', sardinky). Souborně omega-3-mastné kyseliny jsou původu rostlinného, do ryb se dostávají z mořských řas, které jsou na ně velmi bohaté. Tedy sladkovodní ryby tyto omega-3-mastné kyseliny neobsahují (pokud by nebyly krmeny mořskými řasami; v současné době se provádí v jižních Čechách experiment s krmením kapra obecného právě mořskými řasami).

Význam omega-3-mastných kyselin není diskutován jen v souvislosti s potlačením tvorby protizánětlivých cytokinů (Mori a Beilin 2004), ale též v souvislosti s prevencí vzniku kardiovaskulárních chorob (Kris-Etherton *et al.* 2002). V prevenci kardiovaskulárních chorob hraje roli zejména poměr mezi omega-3- a omega-6- mastnými kyselinami, a to zejména díky

tomu, že se tyto mastné kyseliny poměrně rychle začleňují do biologických membrán a ovlivňují vznik látek působících zánět (Kris-Etherton *et al.* 2002).

Omega-6-mastné kyseliny podporují vznik zánětlivých eikosanoidů, které mimochodem vznikají i během cvičení. Omega-3-mastné kyseliny také iniciují vznik eikosanoidů, nicméně typů s mnohem nižší zánětlivou odezvou tj. leukotrienů, tromboxanů a prostaglandinů (Mori a Beilin 2004). Vzhledem k tomu, že řada otázek v hledání optimálního poměru omega-3- a omega-6- mastných kyselin není dosud jednoznačně zodpovězena, a některé studie dokonce uvádějí, že výše popsaný pozitivní efekt omega-3- mastných kyselin se spíše projevuje u nespportovců (lidí netrénovaných) než u lidí s pravidelnou zátěžovou aktivitou (Hill *et al.* 2007), je vhodné se v případě omega-3(6)-mastných kyselin spolehnout spíše na starou pravdu „od všeho trochu“.

1.4 Biologicky aktivní látky v potravinách

Pojem „biologicky aktivní látky“ zahrnuje velice bohatou a různorodou skupinu látek, jejichž společným jmenovatelem je, že v organismech (v užším slova smyslu v lidském organismu) mají nějakou zásadní regulační funkci. Ve stručnosti lze však biologicky aktivní látky rozdělit na látky (i) „tělu vlastní“, které si lidský organismus dokáže sám syntetizovat, a (ii) látky tělu nevlastní (xenobiotika), které přijímá nejčastěji v potravě. Mezi biologicky aktivní látky „tělu vlastní“ patří látky, které si tělo syntetizuje zcela samo buď v rámci běžných metabolických aktivit, nebo např. v důsledku stresového zatížení, tréninku apod., či za pomoci symbiotických organismů přítomných nejčastěji v gastrointestinálním traktu. Jedná se o celou řadu látek; enzymů, hormonů, neuropřenašečů, malých molekul RNA, ale i plynů (např. NO (Jaklová Dytrtová *et al.* 2016b)) a mnoho dalších. Na druhé straně látky, které nejsou lidskému tělu (potažmo živým organismům) vlastní, nazýváme souborně xenobiotika, tedy látky organismům (lidskému tělu) nevlastní (Boháček 2017). Často je toto slovo vnímáno negativně, nicméně pouze vyjadřuje fakt, že se jedná o látky živým organismům (i toto je velmi diskutabilní; co je toxické pro jeden organismus, nemusí druhému buď vůbec škodit, nebo může být pro něj dokonce prospěšné) cizí, a to, zda jsou to látky toxické (jedy) nebo zdraví prospěšné (suplementy, léčiva), už neříká. Xenobiotika jsou tedy látky, které si lidský organismus (pokud se zaměříme pouze na tento zúžený pohled)

sám nevyrobí. Patří sem jak látky, které jsou produkty metabolismu rostlin (někdy i živočichů), tak i látky syntetické, které mohou být některými sloučeninami vyskytujícími se v rostlinné (živočišné) říši inspirovány. V současné době existuje celá řada nově syntetizovaných látek, které se buď záměrně (farmaka) anebo v důsledku propojenosti potravních řetězců dostávají do lidského organismu. Odhad možností rizik spojených s příjmem takovýchto látek je obtížným a velmi nákladným úkolem; je převážně založen na časově, instrumentálně i finančně velmi náročných biochemických studiích.

Na základě předpokládaných účinků můžeme xenobiotika dělit do několika kategorií:

- 1) Léčiva jsou biologicky aktivní lidskému tělu nevlastní látky, účelem jejich vývoje a produkce je jejich očekávaný pozitivní účinek v léčbě různých onemocnění. Nezřídka je jejich pozitivní účinek spojen s celou řadou možných vedlejších účinků, které mají negativní dopad na lidské zdraví. Při posuzování vhodnosti zavedení konkrétního léčiva do praxe je nutné zvážit, *zda pozitivní účinek v léčbě nemoci není již převážen řadou vedlejších účinků.*
- 2) Potravinové suplementy nejsou na rozdíl od léčiv ordinovány v přímé souvislosti s onemocněním. Jejich užití je často pro případy profylaxe, prevence, či zlepšení celkové kondice organismu. Navíc potravinové suplementy nemusejí být látky tělu nevlastní, může se jednat o látky, které si tělo v jisté míře vyrábí samo, anebo se do těla dostávají běžně z potravy. V těchto případech užití potravinového suplementu zvyšuje koncentraci dané tělu prospěšné látky. Základní rozdíl mezi farmaky a látkami obsaženými v potravinových suplementech je, že látky z potravinových suplementů *nesmí mít nežádoucí vedlejší účinky na lidské zdraví.*
- 3) Rizikové látky jsou obecně látky, u nichž se nepředpokládá pozitivní účinek na lidské zdraví, naopak se často jedná o *látky toxické*. Zde je nutno zdůraznit, že o negativním (nebo pozitivním účinku) rozhoduje dávka. Přesto některé látky díky tomu, že jsou toxické i v nízkých dávkách považujeme za jednoznačně toxické, jako jsou například kadmium, olovo, rtuť, většina pesticidů aj. Nicméně lze mezi rizikové látky řadit i tzv. esenciální prvky (např. zinek, měď), či vitamíny rozpustné v tucích, které jsou v jisté nízké koncentraci pro tělo nezbytné, ale v koncentraci vyšší naopak vykazují toxický účinek díky pomalému vyplavování (nebo odbourávání) z těla.

Práce se zaměřuje především na efekt rizikových látek (pesticidů), proto je o nich a jejich účincích pojednáno podrobně v následujících kapitolách. Jako případová studie je v závěru práce zařazeno studium interakcí tebukonazolu (pesticidu/fungicidu) s resveratolem (předpokládaný antioxidant) v přítomnosti kationtů mědi, proto je zde také stručně pojednáno o vlivu antioxidantů; resveratrolu je pak věnována samostatná kapitola.

V současné době se zvláštní pozornosti těší tzv. antioxidanty, a to nejen jako potravinové suplementy určené pro sportovce. Důvodem, proč jsou antioxidanty využívány zejména sportovci, je, že se věří, že redukuje poškození svalů, pozitivně působí na imunitní systém, celkově snižují únavu (Braakhuis a Hopkins 2015). Nejčastěji se do této skupiny řadí vitamín E, quercetin, resveratrol, ale i jiné polyfenolické (správně polyhydroxylové) látky, N-acetylcystein, případně se využívá kombinovaného efektu některých potravin jako je řasa *Chlorella pyrenoidosa*, spirulina (*Arthrospira platensis* a *Arthrospira maxima*) nebo šťáva z červené řepy, kde se využívá pozitivního koktejlového efektu několika složek, přičemž jen málokdy se ví přesně, které složky ovlivňují jaké fyziologické funkce. Případ šťávy z červené řepy je jednou z mála výjimek, kdy se má za to, že pozitivní vliv na sportovní výkon lze přičíst molekule NO, která vzniká postupnou redukcí z dusičnanu přítomného ve šťávě po jejím požití (Jaklová Dyrtrtová *et al.* 2016b).

Důležité je zmínit, že dlouhodobé používání antioxidantů sportovci má spíše negativní dopady (redukce treningové adaptace), snad jen s jediným rozdílem, a to je dlouhodobé používání resveratrolu a jiných polyhydroxylových látek, které by podle některých autorů nemělo mít nežádoucí účinky (Casuso *et al.* 2013; Hart *et al.* 2014).

Důvodem, proč se suplementace antioxidanty krátkodobě doporučuje, je přítomnost reaktivních kyslíkových radikálů v buňkách (zejména mitochondriích) např. v důsledku kyslíkového dluhu, jejichž negativní vliv na organismus právě tyto antioxidanty redukuje. Z tohoto pohledu jsou reaktivním kyslíkovým radikálům vystaveni právě sportovci, protože se během cvičení zvyšuje metabolismus, aby byly pokryty energetické nároky a s tím související vyšší nároky na oxidaci substrátu (nejdříve makroergických substrátů, potom zásobních cukrů, později tuků a v extrémních případech i bílkovin). Vznik kyslíkových radikálů souvisí se zvýšenými nároky na množství O₂ současně s jeho nižší dostupností. Kyslíkové radikály se dostávají z místa katabolických procesů (mitochondrií) do buněk, kde mohou degradovat fosfolipidové membrány, reagovat s celou řadou enzymů, měnit struktury

proteinů atd. V makroskopickém měřítku se zvýšená přítomnost volných radikálů projeví právě poškozením svalů, únavou a poruchami imunitního systému.

1.5 Toxické látky v potravinách

Toxické látky se do potravin nejčastěji dostávají během pěstování plodin, či chovu zvířat, tedy v rámci primární produkce. Dále se zdraví škodlivé látky mohou do potravin dostat během jejich zpracování, či skladování. Při zpracování jsou škodlivými látkami, či látkami s potenciálním vedlejším efektem různá aditiva, jako konzervanty, dochucovadla, barviva, pojiva. O těch již bylo napsáno velké množství publikací, a proto se na ně tato práce nezaměřuje. Další skupinou potenciálně škodlivých látek jsou toxiny, které vznikají v důsledku mikrobiální aktivity, tedy obvykle během nevhodného skladování, či během přepravy potravinu. Vůbec nejnebezpečnější látky pro lidské zdraví jsou aflatoxiny – produkty mikrobiální aktivity rodu *Aspergillus*, které jsou často důvodem škodlivosti dovážených sušených plodů. Ani tímto problémem se práce nezabývá. Práce se zaměří na popis účinků pesticidů (a okrajově rizikových prvků), které se do plodin dostávají v důsledku agrotechnických pěstebních technologií.

Z chemického hlediska můžeme toxické látky rozdělit na dvě skupiny: (i) toxické (rizikové) prvky a (ii) toxické sloučeniny.

1.5.1 Rizikové prvky

Tato skupina látek zahrnuje především anorganické ionty, kdy toxickou složkou dané látky je konkrétní prvek (nejčastěji v iontové formě), např. kadmium (kadmnatý kation, Cd^{2+}), rtuť (jako kov, v iontové formě Hg^+ , Hg^{2+}), arzén (arsenitý a arseničný kation, As^{3+} , As^{5+}), olovo (olovnatý kation, Pb^{2+}), hliník (hlinitý kation, Al^{3+}). Z ekologického, či fyziologického hlediska je možné za toxický (rizikový) považovat prvek, jenž se v daném prostředí vyskytuje v nefyziologickém (toxickém) nadbytku.

Mezi tzv. rizikové prvky (RP) patří především tzv. těžké kovy, tedy kovy s hustotou větší než 5 g/cm^3 – kadmium, olovo, rtuť (Kafka a Punčochářová 2002), ale také tzv. esenciální prvky, které jsou v nízké (fyziologické) koncentraci pro správnou funkci organismu nezbytné,

ale ve vyšších koncentracích jsou již pro organismus toxické. Patří sem např. měď (měďnatý a měďnatý kation Cu^+ , Cu^{2+}), zinek (zinečnatý kation, Zn^{2+}), nebo železo (železnatý a železitý kation, Fe^{2+} , Fe^{3+}). Většinou se jedná o prvky, které jsou funkční součástí většiny enzymatických komplexů nebo pigmentů s transportní, či regulační funkcí. Rizikové prvky se do potravin rostlinného původu dostávají při pěstování plodin, kdy z půdy (méně již z přímé atmosférické depozice) tyto prvky přecházejí do konzumních částí rostlin. Do masných a mléčných (živočišného původu) potravin se rizikové prvky dostávají z potravy zvířat chovných i volně žijících (např. ryby, mořské plody). Rostliny i živočichové se s expozicí rizikovým prvkům mohou vypořádávat tak, že jsou rizikové prvky v těle detoxifikovány navázáním na nízkomolekulární protein (metalothionein), a buď jsou z těla vyloučeny anebo deponovány v tkáních. Případně jsou imobilizovány již v kořenech, často ve formě vysokomolekulárních komplexů fytochelatinů, a uloženy ve vakuolách buněk. V nadzemních částech rostlin se nejčastěji deponují v neaktivních tkáních jako je borka, nebo jsou rizikové prvky transportovány do listů, které opadávají. Do rostlin pronikají rizikové prvky především z půdy, společně s potřebnými živinami (např. Mg^{2+} , Ca^{2+} apod.), tento příjem je zejména intenzivní na živinově chudých půdách, kdy rostliny v důsledku potřeby zajistit dostatečné množství živin exudují do těsného půdního okolí (rhizosféry) tzv. rostlinné/kořenové exudáty (zejména se jedná o nízkomolekulární organické kyseliny), které mobilizují z půdního sorpčního komplexu do půdního roztoku (mobilní část půdy, která stouží mj. ke zpřístupnění živin rostlinám) kromě živin také přítomné rizikové prvky. Tyto prvky potom mohou přecházet přes membrány kořenových buněk do rostlinných těl (Jaklová Dytrtová *et al.* 2009a; Jaklová Dytrtová *et al.* 2011b; Jaklová Dytrtová *et al.* 2009b).

U zvířat je transport a kumulace složitější, především v závislosti na vlastnostech jednotlivých prvků a jejich forem, na způsobu průniku do organismu, suplementaci apod. Stručně je o vybraných rizikových prvcích pojednáno níže.

1.5.1.1 *Kadmium*

Značná část kadmia se do koloběhu dostává z přirozených zvětrávacích procesů hornin a následného vyplavování do řek a oceánů, část pochází také z požárů lesů a vulkanické činnosti uvolňováním do vzduchu. Antropogenní činností se do oběhu dostává zejména

těžbou, během zpracování rud, výroby baterií, spalováním fosilních paliv (v tepelných elektrárnách) a domovních odpadů, aplikací fosforečných minerálních hnojiv a čistírenských kalů do půdy, haváriemi či netěsnostmi skládek odpadů, apod. (Faroon *et al.* 2012)

Kontaminace ornice je pravděpodobně zdrojem největší expozice člověka kadmii, zprostředkované vstupem půdního kadmia do konzumních částí rostlin a listů tabáku (Clemens *et al.* 2013). Kuřáci jsou průměrně s jednou cigaretou exponováni dávkou ca. 1,7 μg kadmia, z čehož asi 10% pronikne do organismu. Na základě studií (v USA) se dále odhaduje, že je u nekuřáků průměrná expoziční dávka z potravin pro dospělé populaci u mužů 0,35 a u žen 0,30 $\mu\text{g Cd/kg/den}$ (Faroon *et al.* 2012).

Z pohledu nebezpečí výskytu kadmia v potravním řetězci oproti ostatním těžkým kovům, je Cd hodnoceno jako velmi nebezpečné z důvodu jeho značné mobility, a to při jeho poměrně nízké dávce, která je již pro lidský organismus toxická (McLaughlin *et al.* 2000), podobně i jeho sloučeniny. V chronickém účinku je karcinogenní (Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny (IARC) byl zařazen tento prvek do první skupiny), způsobuje osteoporózu, anémii, dále cévní a srdeční onemocnění. Ke kumulativnímu účinku dochází dlouhodobým hromaděním hlavně v ledvinách a játrech, ale i velmi malé dávky mohou způsobit selhání ledvin. Akutní alimentární otrava byla v historii poprvé popsána v Japonsku jako choroba Itai-Itai. Ta byla zaznamenána u dětí a starších žen po dlouhodobé konzumaci rýže s vysokým obsahem Cd, která byla pěstována na polích zavlažovaných kaly z čistírny odpadních vod z výroby kadmnatých pigmentů. Akutní intoxikaci provázejí silné bolesti břicha, průjemy, zvracení, znamená pro organismus značnou zátěž, projevuje se poškozením tubulů ledvin a dochází k vyplavování vápníku z kostí (Faroon *et al.* 2012).

Jeho fyziotoxicita spočívá v tom, že dokáže vytěsnit biogenní zinek z různých enzymatických reakcí a narušit tak celé biochemické kaskády. Odvápnění s řídnutím kostí je způsobeno narušením metabolismu vápníku. Nadbytek cukru je způsoben zablokováním cyklu inzulínu (Faroon *et al.* 2012). Kromě toho se podílí Cd v těle člověka na zvyšování krevního tlaku a ovlivňuje i některé další biologické děje – např. zasahuje do procesu arterogenese produkcí prostacyklinu v buňkách cév, kde dochází ke zvýšenému shlukování trombocytů. O přítomnosti tohoto prvku v organismu informuje biologický monitoring – aktuální zátěž na základě množství Cd v krvi, míra kumulace v organismu se prokazuje jeho množstvím v moči (Faroon *et al.* 2012).

1.5.1.2 Olovo

Olovo se v minulosti dostávalo často do organismu inhalací z ovzduší a konzumací plodin vypěstovaných na exponovaných plochách v blízkosti dopravních komunikací, kde byla jeho přítomnost zdůvodněna používáním benzínu s přídavkem tetraethylolova a opotřebáváním strojních součástí. K alimentární expozici dochází rovněž prachem s vysokým obsahem olova v okolí metalurgických továren, kde může být ve vzduchu více než $10 \mu\text{g Pb/m}^3$ vzduchu (TPMC 2003). V atmosféře byla detekována celá řada anorganických sloučenin, z organických sloučenin např. tetraethylolovo, tetramethylolovo, které se rychle fotolyticky rozpadají na trialkylolovo a dále na dialkylolovo, které jsou persistentní (Rhue *et al.* 1992). Olovo patří mezi prvky (As, Cr a Hg), které jsou silně vázány na pevnou fázi půdy, proto k jeho akumulaci do rostlin a půdních organismů nedochází v tak velké míře a nepředstavuje tak velké riziko (ve srovnání s Cd) (McLaughlin *et al.* 2000). Do organismu může vstupovat také s pitnou vodou kontaminovanou z potrubí a mosazných ventilů, z matečné horniny, pigmentů barev, apod.

Vstup olova z prostředí do těla člověka je stále především inhalací par nebo prachu (z toho 40-50% absorbováno přes dýchací systém do krevního řečiště), požitím (10% absorbováno přes trávicí trakt do krve, kde je z 95-98 % vázáno na erythrocyty) a v omezené míře i pokožkou (Sakai 2000).

Potencionální nebezpečí spočívá v karcinogenním účinku, způsobuje zvýšení chromosomových aberací a výměnu sesterských chromatidů (TPMC 2003). V lidském organismu se převážně kumuluje v kostech, při nedostatku vápníku se může mobilizovat (antagonismus) a vstupovat do krevního oběhu a poškozovat tak játra, ledviny, reprodukční systém, centrální nervový systém, u dětí může docházet k mentální retardaci i při relativně nízké expozici, v rozmezí hladiny Pb v krvi $5-35 \text{ mg L}^{-1}$ dochází s každým navýšením o 1 mg L^{-1} ke snížení IQ o 2-4 body (Verstraeten *et al.* 2008), může i přes placentu působit teratogenně (Kafka a Punčochářová 2002). Onemocnění olovem (plumbemie) se projevuje u dospělé populace při koncentraci olova v krvi kolem $500 \mu\text{g L}^{-1}$; přípustná hodnota je $400 \mu\text{g L}^{-1}$; těžká otrava olovem se projevuje při koncentracích nad $1\,000 \mu\text{g L}^{-1}$ (ATSDR 2005).

1.5.1.3 Zinek

Zinek patří mezi esenciální prvky, tj. jistá fyziologická koncentrace zinku je nutná pro zachování a správnou funkci některých biochemických pochodů. Nicméně ve vyšších než fyziologických koncentracích je zinek škodlivý. Lidské tělo (dospělý 70 kg muž) obsahuje cca 3 g zinku. Udává se, že cca ¼ světové populace je ohrožena rizikem deficitu Zn, přičemž se především jedná o populace ohrožené chudobou, nedostatečně pestrou stravou neobsahující dostatek přijatelného Zn (Maret a Sandstead 2006). Na druhé straně populace žijící v hojnosti, díky přijímání dodatečného Zn v podobě suplementů, jsou částečně ohroženy jeho nadbytkem. Riziko toxického působení nadbytku Zn spočívá především v tom, že nadbytek Zn blokuje příjem a utilizaci Cu.

Zinek je součástí stovek enzymů také proteinových oblastí. Zn je důležitý především pro růst, vývoj, diferenciaci buněk, metabolismus DNA, správnou funkci imunitního systému, hojení, reprodukci, zrak, pociťování chuti, proces učení, ale také pro apoptózu (Fraker a King 2004; Golub *et al.* 1995; Vallee a Falchuk 1993). Často je opomíjena jeho esencialita pro neurogenezi (především během prenatálního vývoje), neuropaticitu mozku projevující se především růstem neuronů (během prenatálního vývoje i postnatálně) a synaptogenezi (Maret, 2006 – 12-15). Také se podílí na přenosu nervových vzruchů; jako Zn^{2+} je uložen ve specifických vesikulech na synapsích glutaminergních neuronů (Frederickson *et al.* 2005).

V řízení homeostázy a příjmu zinku se podílí celá řada enzymů a bílkovin, které se podílejí především na regulaci buněčně vázaného Zn, transportu a distribuci. Celou problematiku je těžké jednoznačně popsat, protože právě tyto enzymy a bílkoviny vykazují v rámci celkosvětové populace velkou variabilitu, která však většinou nevede k fatálním následkům. Nicméně např. *acrodermatitis enteropathica* je geneticky podmíněná porucha příjmu a absorpce Zn, která je způsobena mutací bílkoviny zprostředkávající transport Zn Zip4 (Maverakis *et al.* 2007). Existuje sice obecně doporučované množství Zn, které má být denně přijato (4,7 až 18,6 mg) v potravě (Maret a Sandstead 2006), nicméně, díky vysoké variabilitě enzymů a bílkovin participujících na příjmu, transportu a utilizaci, je nutno tento interval brát jako velmi přibližný v odhadu stanovování optimálního individualizovaného množství.

1.5.1.4 Měď

Měď patří na rozdíl od těžkých kovů mezi prvky ambivalentní povahy, na jednu stranu je v určité míře nezbytná (esenciální) ve výživě rostlin, zvířat i člověka (podílí se např. na různých enzymatických pochodech), ale také může ve zvýšených dávkách působit toxicky (Scheiber *et al.* 2013). V rámci zemědělské produkce jsou ke zvýšeným koncentracím mědi především citlivé nižší rostliny, plísně a bakterie (McLaughlin *et al.* 2000), čehož se využívá v zásazích proti plísním a bakteriím postřikem roztokem měďnatých solí (např. k ošetření vinné révy).

Esencialita mědi spočívá především v tom, že je součástí enzymů (např. tyrosinasy), které ovlivňují činnost oxidáz. Její přítomnost v lidském organismu je nezbytná pro metabolismus železa, nedostatek bývá příčinou zhoršené syntézy hemoglobinu a následně vzniku anémie. K případnému hromadění Cu v těle dochází především v játrech a kostní dřeni a její zvýšené množství způsobuje poškození jater a ledvin, zprvu zažívací obtíže až krvácení zažívacího traktu (Kafka a Punčochářová 2002). Nemoc způsobená chronickým nahromaděním Cu v játrech, ledvinách, mozku a oční rohovce se označuje jako Wilsonova nemoc. Nemoc vzniklá nahromaděním Cu u dětí mladších tří let se nazývá Mankesova choroba a projevuje se poškozením nervové soustavy, zejména pak korových oblastí předního mozku, které vedou k duševní i fyzické retardaci a někdy končí i smrtí (Havlíčková 1998).

1.5.1.5 Železo

Železo je esenciální prvek pro zajištění životaschopnosti savčích buněk a tkání. Je nezbytný pro přenos kyslíku prostřednictvím hemu, v mitochondriálním dýchacím řetězci (cytochromy) a v rámci enzymů, jako jsou ribonukleotidreduktázy. Existuje několik homeostatických mechanismů pro regulaci intestinálního příjmu železa (dvanácterníkem) z potravy a buněčného příjmu železa. Jelikož ale není organismus vybaven exkrečními mechanismy pro železo, a tedy se může přebytek přijatého železa kumulovat v tkáních, hrozí při předávkování suplementy vznik toxického účinku s následným ovlivněním více orgánových systémů. Běžnou stravou přibližně přijmou dospělí jedinci 10-50 mg Fe/osoba/den (v závislosti na pohlaví (ženy méně), formě železa (ze zeleniny méně – tvorba

chelátových komplexů) a dalších přítomných látkách (vitamín C)), ale dvanácterníkem se vstřebává pouze asi 10%. (Vallerio 2007)

Množství železa v potravinových doplňcích je regulováno z důvodu potenciální otravy především u malých dětí. Terapeutická dávka elementárního železa při anémii z nedostatku železa je 3-6 mg/kg/den. Toxické účinky se mohou objevit při dávkách nad 10 až 20 mg/kg elementárního železa. Požití více než 50 mg/kg elementárního železa jsou již spojeny se závažnou toxicitou.

1.5.1.6 Hliník

Hliník se v organismu chová podobně jako železo, často s ním bývá v kompetici v řadě důležitých biologických drah. V tělních tekutinách se nejvíce váže na citrát, v plasmě také na albumin. Také serotransferrin v plasmě přednostně (89%) přenáší hlinité ionty než železité. Silně se váže také na fosfátové skupiny. Může zvyšovat průchod lipofilních molekul přes hematoencefalickou bariéru.

Toxicita hliníku se může zvyšovat zejména při nedostatku železa. Hliník se váže na transferin, nepřímo tam může způsobovat nedostatečný příjem železa gastrointestinálním traktem. Také může ovlivnit tvorbu červených krvinek (erytropoézu) spouštěnou při deficitu kyslíku, čímž může dojít až k anemickým stavům (Zatta a Alfrey 1997).

1.5.2 Pesticidy

Skupina toxických sloučenin zahrnuje (kromě anorganických) nekonečnou škálu organických sloučenin. Jedná se často o látky se stabilní strukturou (tzv. aromatické sloučeniny), případně látky obsahující ve své struktuře nějaký toxický prvek (např. methylrtuť, tetraethylolovo). V rámci persistentních organických polutantů, jejichž chronická rizikovitost, ale také sledovanost a legislativní opatření jsou v současnosti prioritou, jsou dle struktury rozlišovány polycyklické aromatické uhlovodíky, polychlorované bifenyly, polychlorované dibenzo-p-dioxiny a dibenzofurany a organochlorové pesticidy. Tolik tedy nežádoucí produkty spalování (chlorovaných) uhlovodíků, dřívější aditiva a v současnosti zakázané pesticidy. Je zde ovšem obrovské množství potenciálně nebezpečných látek, které

jsou hojně používány, tedy jsou i jejich rezidua často přítomna v konzumované potravě, a těmi jsou (povolené) pesticidy.

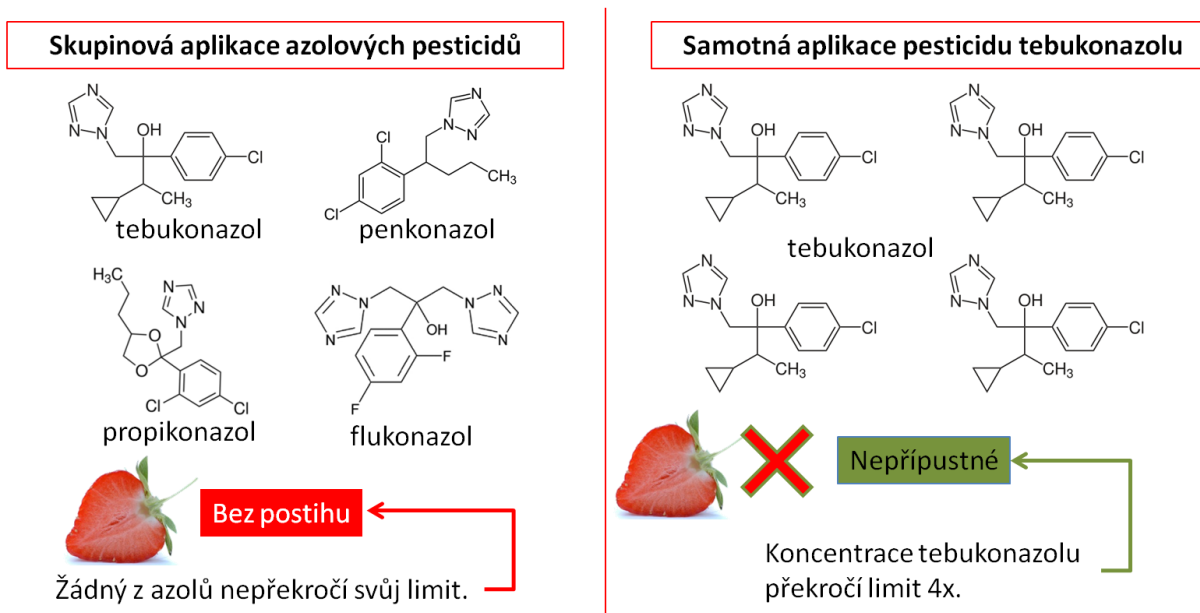
Pro představu uvádím odhad ročního celosvětového obchodu s pesticidy na základě údajů z let 2008 – 2012: Celkově se prodá přes 2,6 milionu tun pesticidů (stále se zvyšuje), výrazný podíl trhu připadá na herbicidy – asi 1,3 mil. tun (49%, z toho 91% v zemědělství), insekticidy, fungicidy a fumiganty jsou obchodovány zhruba vyrovnaně; fungicidů se prodá 360 tisíc tun (14%, z toho 82% v zemědělství) (Atwood a Paisley-Jones 2017). Pesticidům se podrobněji věnují následující kapitoly.

1.5.2.1 Legislativní rámec využití pesticidů v zemědělství a jeho dodržování

Aplikace pesticidů během produkce potravin je regulována v rámci Nařízení 470/2009/ES, kterým se stanoví postupy Evropského Společenství pro stanovení limitů reziduí farmakologicky účinných látek v potravinách živočišného původu, Nařízení 37/2010/ES o farmakologicky účinných látkách a jejich klasifikaci podle maximálních limitů reziduí v potravinách živočišného původu a Nařízení 396/2005/ES, které se týká maximálních limitů reziduí pesticidů v potravinách a krmivech rostlinného a živočišného původu a na jejich povrchu (Vyhláškou 278/2010 Sb. se ruší původní Vyhlášky s limity nejvýše přípustných reziduí). Tyto směrnice shodné pro státy Evropské unie obsahují jak seznam povolených látek, tak množství jednotlivých látek, které je možné aplikovat, též je uveden způsob a minimální čas před sklizní (tzv. ochranná lhůta), kdy je možno pesticid aplikovat. Dále jsou zde uvedeny přípustné limity pro jednotlivé pesticidy, které jsou tolerovány.

Vzhledem k zaměření této práce není nutné uvádět jednotlivé hodnoty. Pravdou je, že většina evropských producentů potravin se tyto zákonem dané limity a směrnice snaží dodržovat. Nicméně je třeba se zamyslet nad způsobem, jakým jsou tyto legislativní požadavky uváděny do praxe. Z legislativní dikce vyplývá, že přípustné limity jsou udávány pouze pro jednotlivé pesticidy, nikoli souborně pro stejným (podobným) způsobem působící pesticidy. Což v praxi vede k tomu, že limity pro jednotlivé pesticidy jsou sice dodržovány, nicméně nižší množství pesticidů je nezřídka kompenzováno použitím více chemicky různých pesticidů, ale se stejným účinkem. Toto tedy znamená, že posuzujeme-li závadnost/nezavadnost potravinového produktu na základě všech přítomných zdraví

škodlivých látek (tedy sumaci jejich toxického účinku), může potravina obsahující podlimitní koncentrace jednotlivých pesticidů působit na lidské zdraví i velmi škodlivě (obr. 8). Tímto způsobem se často také obchází zákonem daná minimální doba aplikace pesticidů před sklizní. Většina pesticidů se totiž v životním prostředí (ať již účinkem fotodegradace nebo biodegradací) transformuje (někdy jsou však produkty transformace stejně toxické jako původní látka, nebo dokonce toxičtější). Tímto aplikačním opatřením se má snížit obsah pesticidů před vlastní konzumací produktu. Často se tohoto způsobu využívá zejména u ovoce. Ale vzhledem k tomu, že přítomnost pesticidů (zejména fungicidů) chrání ovoce i během transportu, je toto nařízení někdy obcházeno (současnou aplikací několika pesticidů se stejným účinkem místo aplikace jednoho). Klasickým příkladem jsou např. jahody, které než se na stůl zákazníka dostanou, procestují doslova půl světa.



Stejný efekt na potlačení biosyntézy sterolů.

Neznámý skupinový a koktejlový efekt azolů.

Často je koncentrace jednotlivých azolů pod mezí detekce používaných analytických metod. Proto neexistuje možnost zasáhnout.

Jak tuto situaci řešit?

- Vyvinout metodu umožňující detekovat stejně působící pesticidy v sumě.
- Studovat skupinový a koktejlový efekt používaných pesticidů.

Obr. 8. Rozdíl ve skupinové aplikaci pesticidů (demonstrováno na příkladu azolů) oproti samotné aplikaci jen jednoho pesticidu (tebukonazolu). Více informací ke konkrétním účinkům azolů je dále v textu.

Dalším aspektem, který není legislativně zohledněn (a částečně souvisí i s předchozí „multi-pesticidní“ aplikací), je synergický a koktejlový efekt, který sebou přirozeně přináší současná aplikace několika pesticidů. Na obranu tvůrců legislativy je však nutno podotknout, že velmi často chybí vědecké informace právě o synergickém a koktejlovém chování pesticidů. V tomto ohledu lze předeslat, že elektrochemické zařízení v kombinaci s hmotnostním spektrometrem popisované v této práci představuje potenciálně levný a dostupný způsob, jak synergické a koktejlové chování pesticidů studovat *ex situ*.

1.5.2.2 Negativní účinky pesticidů na fyziologické funkce

Akutní expozice pesticidům zahrnují příznaky jako je podráždění pokožky a očí, bolest hlavy nebo nauzea, které však v případě běžné konzumace potravin nejsou časté. Časté jsou spíše u exponovaných farmářů a dělníků. Běžná populace je ohrožena především chronickou expozicí pesticidů spojenou s konzumací potravin. Chronická expozice pesticidům je jednou z možných příčin vzniku rakoviny, astmatu a cukrovky druhého typu (Kim *et al.* 2017). Za vznikem těchto chronických onemocnění stojí často více vlivů (včetně genetických dispozic), takže je těžké vysledovat všechny spouštěcí faktory, nicméně se stále častěji setkáváme se studii, které potvrzují chronickou expozici pesticidů jako jeden z hlavních faktorů zapříčiňujících mimo jiné vznik migrén, kognitivních poruch, hormonálních a metabolických poruch či autismu (Van Maele-Fabry *et al.* 2011).

Pesticidy jsou látky, které byly záměrně vytvořeny tak, aby ničily specifické škůdce (plísňe, hmyz, hlodavce, plevel a další). První syntetizovaný pesticid byl v roce 1874 dichlordifenyltrichlormethan (DDT), jehož insekticidní účinky byly popsány v roce 1939. V roce 1998 již bylo na trhu 20 000 komerčních produktů registrovaných v kategorii „pesticid“. US Environmental Protection Agency klasifikuje pesticidy do několika skupin podle jejich potenciální nebezpečnosti: extrémně nebezpečný, vysoce nebezpečný, středně nebezpečný a mírně nebezpečný. Podle jejich střední délky života jsou rozdělovány jako permanentní, perzistentní, středně perzistentní a neperzistentní. Podle jejich chemické struktury se dělí zejména na organochloriny, organofosfáty, karbamáty a pyretriny.

Organochloriny jsou v životním prostředí persistentní látky, které mají tendenci se akumulovat v tukových tkáních (Waliszewski *et al.* 2003). Využívají se při pěstování vína,

salátu, rajčat, kukuřice, rýže a dalších plodin. V lidském organismu působí na úrovni centrální nervové soustavy, kdy mění elektrofyziologické parametry plasmatické membrány; konkrétně mění kinetiku Na^+ a K^+ toků přes plasmatickou membránu během akčního potenciálu (vzruchu) (Narahashi 1992). Výsledkem je pak nekontrolované rozšíření akčního potenciálu a možný vznik i epileptického záchvatu (Tordoir a van Sittert 1994).

Organofosfáty jsou estery kyseliny fosforečné. Inhibují funkci acetylcholin esterázy, což je enzym působící rozklad neurotransmiteru acetylcholinu po proběhlém vzruchu. Takto jsou blokovány acetylcholinové kanály, které jsou přítomné v centrální nervové soustavě, ale také v synapsích motoneuronů, kde signalizují svalovou kontrakci. Mezi symptomy intoxikace organofosfáty patří ztráta reflexů, bolest hlavy, dezorientace, křeče, kóma, případně smrt (Abou-Donia 2003). Jistě nezanedbatelná je schopnost alkylace, která může mít význam v interakci s DNA, kdy přidávání methylových skupin na nukleotidové báze může zásadním způsobem ovlivnit proces transkripce (Garbellini *et al.* 2013). Organofosfáty jsou nejpoužívanějšími pesticidy v zemědělství vůbec; využívají se při pěstování zeleniny, ovoce, obilovin, cukrové třtiny i dalších.

Karbamáty jsou deriváty esterů kyseliny dimethyl-N-methylkarbamové. Využívají se jako herbicidy, insekticidy, fungicidy i nematocidy. Jsou méně persistentní než organofosfáty a organochloriny, též inhibují acetylcholinesterázu (Čolović *et al.* 2013).

Pyretriny jsou odvozené od přírodního insekticidu extrahovaného z chryzantém (Sogorb a Vilanova 2002). Působí v centrální nervové soustavě tak, že mění dynamiku sodíkových kanálů v membráně nervových buněk; zvyšují čas jejich otevření, a tedy zvyšují proud způsobený tokem Na^+ do buňky, a to jak u hmyzu, tak i u obratlovců (Sogorb a Vilanova 2002). Zvýšení sodíkového proudu během akčního potenciálu způsobí hyperexcitaci.

Navzdory benefitům, které pro společnost využívání pesticidů má, je jasné, že se jedná o toxické látky, které neselektivně ovlivňují jakýkoliv biologický systém (Prieto Garcia *et al.* 2012).

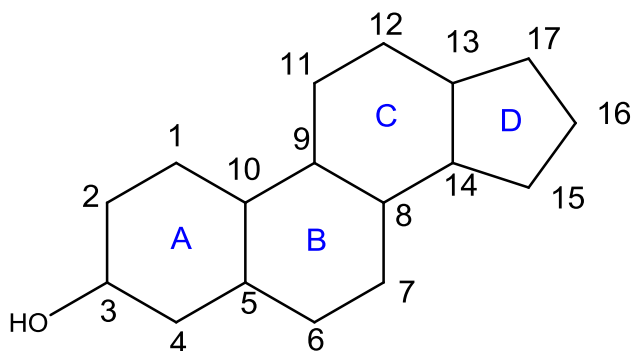
1.5.2.3 Vliv pesticidů na přenos nervového vzruchu

Většina pesticidů (co se týče jejich druhů a množství) účinkují na živočichy na úrovni synapsí nebo axonu. Cholinergní systém byl původně vybrán jako cílový u hmyzu, nicméně se

vyskytuje i u obratlovců (tedy i člověka). Konkrétně se jedná o přenos vzruchu mezi motoneurony a též v některých částech neokortexu. Negativní účinky pesticidů souvisí s inhibicí acetylcholinesterázy, a tím s prodloužením excitačních účinků acetylcholinu (Casida 2009). Nikotinacetylcholinový receptor je cílový pro neonikotinoidy, které jsou kompetitivními agonisty pro acetylcholin. Např. pesticidy spinosiny (často používané v ochraně růží nebo ovocných stromů) jsou alosterické modulátory a kartap (S,S'-2-dimethylaminotrimethylen bis(thiokarbamát) hydrochlorid) je nekompetitivní antagonist a používán zejména jako insekticid. Kanály pro sodík otevíratelné (axonální) změnou napětí jsou cílové pro DDT, pyretriny a pyretroidy, které fungují jako modulátory; dále oxadiaziny (indoxacarb) nebo semikarbazony (metaflumizon) fungují jako blokátory. Synaptická neurotransmise GABA kanálu pro Cl⁻ jsou cílové pro nekompetitivní antagonisty a blokátory (cyklodieny (endosulfan) a fenylpyrazoly (fipronil)). Glutamát-chloridové kanály nervových a svalových buněk jsou stimulovány ivermektiny, čímž způsobují nadměrný tok Cl⁻ iontů do buňky, což vede k zastavení šíření vzruchu. Ivermektiny se používají jako širokospektrální antiparazitikum (proti hlístům i některým ektoparazitům z čeledi hmyzu) nejen v humánní medicíně (Crump a Omura 2011). Tzv. G-protein spojený s octopaminovým receptorem je cílový pro agonistu amitráz (*N,N'*-[(methylimino)dimethylidyn]di-2,4-xylidin), který je nesystémovým akaricidem a insekticidem (Corta *et al.* 1999).

1.5.2.4 Vliv pesticidů na biosyntézu sterolů

Steroly (**obr. 9**) se nacházejí u hub (mykosteroly), rostlin (fytoosteroly) i živočichů (zoosteroly). Jejich biosyntéza je odvozena od triterpenů (skvalen) a patří mezi odvozené lipidy. Z původního skvalenu se u eukaryotických organismů v přítomnosti kyslíku vyvinuly steroidy, zatímco u prokaryotických organismů v bezkyslíkatém prostředí tzv. hopanoidy (viz kapitola věnovaná lipidům). Jejich deriváty mají v organismech rozmanité funkce; jsou součástí biomembrán (u lidí cholesterol) ale také jako pohlavní a stresové hormony. Narušení jejich biosyntézy tedy může mít za následek (i) snížení stability plazmatické membrány, (ii) poruchy hladin pohlavních hormonů, (iii) průběh akutní i chronické stresové reakce.



Obr. 9. Obecná struktura sterolů.

Pesticidy, které narušují biosyntézu sterolů, jsou nejčastěji ze skupiny azolů, které podle jejich chemické struktury dělíme na triazoly a imidazoly. Nejčastěji inhibovaný krok biosyntézy je C14 α -demethylace na úrovni CYP51 a aromatázy. Informace o účincích azolů na inhibici těchto enzymů jsou především studovány *in vitro*, studie *in vivo* jsou ojedinělé. Z tohoto důvodu je jasné, že do budoucna bude třeba pro odhad rizik spojených s rozšířením azolů jako pesticidů, ale též jako léků v humánní medicíně rozšířit rozsah experimentů především o *in vivo* studie.

Azoly se používají nejen v zemědělství (cyprokonazol, tebukonazol, penkonazol a další), ale také v humánní medicíně. Obecně azolové sloučeniny mají antimykotické účinky, a to jak v prevenci (antifungální ochrana dřeva), tak i v léčbě. Metabolické přeměny azolů u rostlin i živočichů byly popsány např. v Roberts a Hutson (1999). V humánní medicíně jsou azoly využívány zejména k léčbě kožních mykóz (Georgopapadakou 1998). Jejich výhodou oproti jiným dermálním antimykotickým lékům (např. antimykotikům) je, že proti nim vzniká poměrně malá rezistence. Jmenovitě se z azolů běžně k léčbě mykóz využívají triazoly terkonazol, itrakonazol a flukonazol, dále pak imidazoly clotrimazol, tiokonazol, izokonazol, ketokonazol, oxikonazol, fentikonazol a ekonazol. Dále se azoly využívají k léčbě postmenopauzálních nádorových onemocnění citlivých na změnu hladiny estrogenů, jako je rakovina prsu (Murray 2001). Po menopauze prudce klesá hladina estrogenů, protože se minimalizuje jejich syntéza ve vaječnících; hlavní produkci estrogenů tak přebírá tuková tkáň. U pacientek, které trpí rakovinou prsu, dochází k tomu, že prsní a těsně přiléhající tkáň produkuje aromatázu, která slouží k biosyntéze estrogenů (Santner *et al.* 1997)). Tato lokální produkce estrogenů vlastně podporuje růst nádorů produkujících estrogenu. Medikace azoly

(letrozol, anastrozol, vorozol, exemestan a fadrozol) inhibuje aromatázu, čímž tlumí rozvoj nádoru prsní tkáně (Brueggemeier 2006; Zarn *et al.* 2003). Teoretickou možností je využití azolů u chlapců s opožděným nástupem puberty a tělesným vzrůstem, kdy byl navržen k medikaci letrozol (Wickman *et al.* 2001). Mechanismem účinku v tomto případě je, že azoly blokují maturaci kostní tkáně, která je závislá na obsahu estrogenu. Potenciální využití azolů v léčbě těchto onemocnění (dle (Stanhope 2001) neprůkazné) jen dokazuje, že azoly mají nezanedbatelný vliv na hladiny pohlavních hormonů a s tím související pochody.

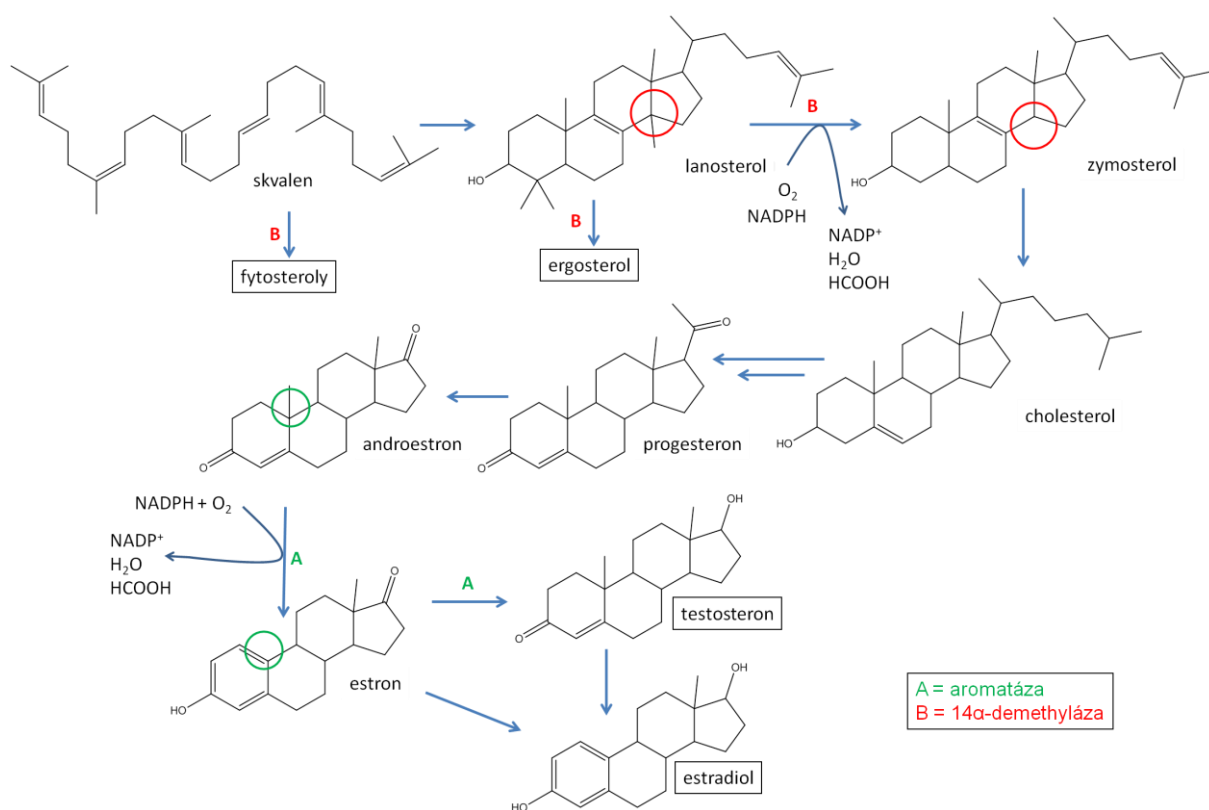
Aromatáza (kterou kóduje gen pro CYP51) je rozhodující v udržení fyziologické rovnováhy mezi androgeny a estrogeny. Pohlavně specifický poměr androgenů a estrogenů je důležitý především pro správný vývoj pohlavních orgánů a plodnost. Disbalance v poměru pohlavních hormonů vede nejen k poruchám pohlavního vývoje, ale též k rozvoji chorob citlivých na změnu hladiny estrogenů.

14 α -demethyláza (kódovaná genem pro CYP19) sterolů je klíčový enzym v biosyntéze meiózu-aktivujících sterolů, které se uplatňují jako modulátory vývoje zárodečných buněk u obou savčích pohlaví. 14 α -demethyláza patří do rozvětvené rodiny hem-obsahujících enzymů komplexu cytochrom P450, které jsou zodpovědné za metabolické přeměny xenobiotických látek, viz. příslušná kapitola.

U hub a kvasinek je účinky azolů narušena (popsanou inhibicí 14 α -demethylace) soudržnost biologických membrán, kde jejich hlavní stabilizující komponentou je ergosterol. 14 α -demethyláza se nachází u řady dalších organismů počínaje archebakteriemi a člověkem konče. Genetický předpis pro 14 α -demethylázu je znám u řady živočichů, včetně člověka (Waterman a Lepesheva 2005). Na úrovni primární struktury bílkovin (sekvence aminokyselin) se jedná o značně konzervativní strukturu; homologie sekvence aminokyselin mezi člověkem a krysou je 93%, mezi člověkem a houbou 40% (Strömstedt *et al.* 1996). U lidí je 14 α -demethyláza exprimována v celé řadě rozdílných tkání (Raucy *et al.* 1991).

U savců je pomocí 14 α -demethylázy skvalen konvertován na steroly aktivující meiózu (MAS). Jedním z účinků těchto prekurzorů cholesterolu byl vývoj zárodečných listů v závislosti na pohlaví.

Jak již bylo řečeno výše, prekurzorem pro syntézu všech sterolů je skvalen, který má lineární strukturu. Je výchozím substrátem pro fytosteroly, ergosterol, cholesterol a pohlavní hormony (**obr. 10**).



Obr. 10. Zjednodušené schéma biosyntézy sterolů (upraveno a doplněno dle Zarn *et al.* (2003))

1.5.2.5 Vliv pesticidů na dýchací řetězec

Buněčné dýchání je souborný název pro kaskádu dějů, jimiž je ukončena metabolická přeměna cukrů, tuků i bílkovin. Dochází k němu v mitochondriích s využitím obou membránových systémů mitochondrie i mitochondriálního matrix. Zjednodušeně zde dochází k oxidaci NADPH a FAD vzniklých v Krebsově cyklu, či během β -oxidace mastných kyselin a vzniku ATP. Koncovým akceptorem uvolněných elektronů a vodíkových protonů je O_2 ; vzniká voda. Právě dostupnost O_2 jako konečného akceptoru elektronů a H^+ souvisí s možností vzniku reaktivních (a toxických) volných kyslíkových radikálů. Biochemický aparát dýchacího řetězce je tvořen pěti membránovými komplexy (I-V). Pesticidy působí hned na

několika katalytických úrovních dýchacího řetězce. Nejčastěji (i) blokují nebo poškozují vazebná místa membránových komplexů, (ii) narušují vazbu substrátu, a tím blokují oxidační fosforylaci či tvorbu protonového gradientu.

Např. rotenon a některé miticidy inhibují vazbu na vazebné místo PSST b komplexu I (Schuler a Casida 2001). Karboxin a metabolity cyanopyrafenu inhibují sukcinin dehydrogenázu v komplexu II, quinolové oxidační centrum komplexu III je blokováno strobiluriny. Acequinocyl inhibuje vazebné místo 2 komplexu III. Bifenazat blokuje na cytochromu b místo Q_0 . Cyazofamid a amisulbrom se váží na Q_i místo cytochromu bc1. Kyanidiny a fosfiny (používají se jako fumiganty na ochranu cereálií a jádrového krmiva) blokují komplex IV (Chaudhry 1997). Karboimididy a trioganotiny blokují ATP syntázu komplexu V (Holloway *et al.* 2008). Chlorfenapyr brání vazbě substrátu během oxidační fosforylace, čímž zabraňuje produkci ATP (během oxidační membránové fosforylace v mitochondriích oxidázy nejprve odstraní N-ethoxymethylovou skupinu chlorfenapyr a vytvoří jeho derivát, který pak brání syntéze ATP v dýchacím řetězci). Zamezení produkce ATP vede k buněčné smrti (Raghavendra *et al.* 2011). Fluorocitrát je metabolitem insekticidu fluoroacetátu, jenž inhibuje akonitázu cyklu trikarboxylových kyselin, což vede k lokální inhibici metabolismu porušením Krebsova cyklu (Swanson a Graham 1994).

U pesticidů účinkujících na úrovni dýchacího řetězce proti živočišným škůdcům je velmi problematické navrhnout selektivní inhibitory patřičných procesů, protože enzymatická podobnost dějů probíhajících v eukaryotické živočišné buňce je vysoká. Proto jejich lokální účinky u lidí jsou podobné jako u hmyzu. Stejný makroskopický efekt, tedy inhibice dýchacího řetězce vedoucí k akumulaci volných radikálů a nedostatku ATP (mající za následek buněčné hladovění) následované apoptózou. U lidí se významně projeví důsledek apoptózy až po nesrovnatelně vyšší dávce pesticidů. Jsou však tkáně, které jsou citlivé i na poměrně malá množství pesticidů blokujících dýchací řetězec, a to jsou především nervové buňky. Zejména neurony šedé kůry mozkové jsou k blokování dýchacího řetězce extrémně citlivé, protože jsou vybaveny bílkovinou PHD1 (Vyskočil 2016), která při jen mírném nedostatku O_2 , či ATP spouští apoptózu. Pravděpodobně zde funguje princip „vše nebo nic“ tj, v tomto případě lépe nefungovat vůbec než špatně. Pro tyto neurony je z nějakého důvodu výhodnější spustit apoptózu dříve než je poškodí volné radikály.

1.6 Kumulativní a koktejlový efekt toxických látek

Pokud hovoříme o nežádoucím účinku jednotlivých toxických látek, vždy uvažujeme jejich tzv. hladinu toxicity, což je nejčastěji množství vyjádřené v poměru vůči hmotnosti jedince. V běžné praxi však jednotlivé toxické látky svůj zákonem stanovený limit nepřekračují. Nicméně v případě potravin, které jsou konzumovány dennodenně, naše zdraví ohrožuje tzv. kumulativní efekt (Hass *et al.* 2012; Kortenkamp 2014; Rieke *et al.* 2014). Dalším problémem, který je třeba uvažovat, je možnost vzájemné interakce některých látek mezi sebou (skupinový nebo koktejlový efekt), případně synergické chování, nebo chování součinné. Aby bylo možné nějakým způsobem charakterizovat kumulativní efekt s ohledem na různé varianty koktejlového efektu, byly vytvořeny tzv. „Cumulative assesment groups“ (CAGs), které se projevují společnými aditivními efekty. Jedná se tedy o skupiny látek s podobnými toxikologickými účinky (EFSA 2013; Kennedy *et al.* 2015).

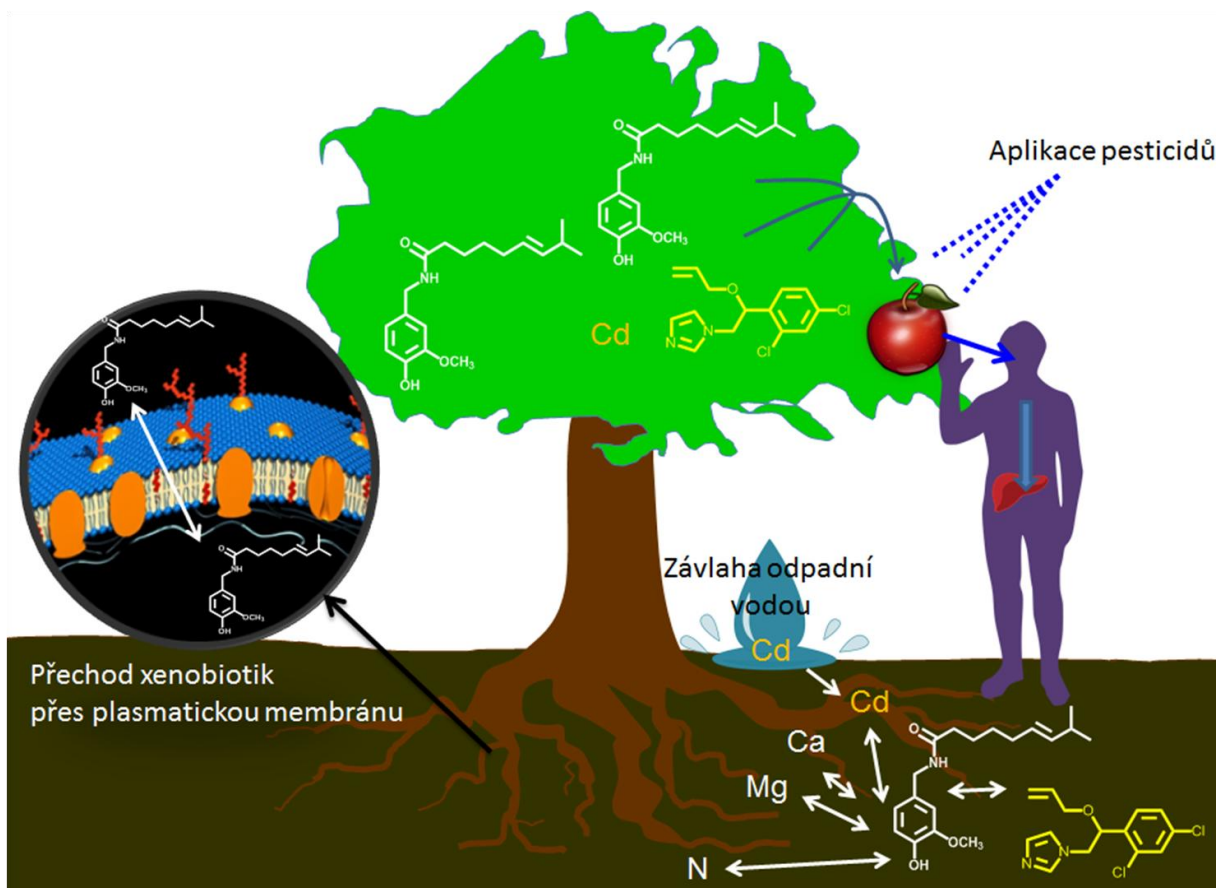
Jedna CAG skupina byla vytvořena i pro triazolové fungicidy, kterým je věnována značná část této práce, včetně části experimentální. Tato triazolová CAG skupina čítá 11 triazolů, které působí hepatotoxicky (EFSA 2009). V játrech tyto triazoly působí jako blokátory konstitutivního androstanového receptoru (CAR) a pregnantního X receptoru (PXR) (Nesnow *et al.* 2009; Peffer *et al.* 2007). Dále azoly působí na výše popsané procesy související s biosyntézou sterolů.

V tomto směru příliš publikovaných experimentů *in vivo* není; pokud jsou, tak z pochopitelných důvodů ne na lidských objektech. Není zde předpokládán bezprahový účinek a i práh akutního účinku u člověka lze vždy jen odhadovat. Jak již bylo naznačeno dříve, u retrospektivních studií je zásadním problémem eliminace účinků jednotlivých faktorů. Smidt *et al.* (2016) prováděl zajímavý experiment, kdy po dobu 28 dní krmil laboratorní myši potravou obsahující velmi nízké koncentrace čtyř triazolů. Pokoušel se tak vysvětlit tzv. „low dose“-efekt (Rhomberg a Goodman 2012; Vandenberg *et al.* 2012). Za příznivý výsledek studie lze považovat, že se negativní působení triazolů pouze sčítalo, nedocházelo tedy k znásobenému negativnímu efektu. Přesto nízké dávky čtyř triazolů projeví nižší hmotností jaterní tkáň, dále potom typické narušení biosyntézy sterolů a další efekty, které však nebyly statisticky průkazné.

Do budoucna je třeba počítat s tím, že i když v potravinách nejsou překročeny limity jednotlivých toxických látek, jejich účinek v sumě se však negativně projevit může, zvláště pokud se jedná o chemické látky s podobnými účinky.

Vzájemnou interakci více látek nazývanou koktejlovým efektem je velice složité komplexně postihnout (Vasquez *et al.* 2014). Je třeba říci, že se nemusí jednat pouze o vzájemnou interakci rizikových látek mezi sebou, ale třeba i několika rizikových látek s přirozeně se vyskytující (jinak netoxickou) biologicky aktivní látkou. Koktejlový efekt se může projevit na několika vzájemně propojených úrovních. Primárně se rizikové látky dostávají do životního prostředí v důsledku činností spojených se zemědělskou produkcí, průmyslem, dále též v odpadech ve formě farmaceutik a jejich reziduí, z potravinářského průmyslu. Nejčastějším cílovým prostředím, kam se toxické látky dostávají, je voda (v případě, že její čištění buď není, nebo je nedostatečné, nebo nedostatečně specifické pro některé komponenty), dále půda, kam se toxické látky dostávají během zemědělské produkce nebo během zavlažování odpadní vodou. Z vody i z půdy se tyto cizorodé látky dostávají do potravních řetězců; podle jejich povahy přecházejí buď do vodních živočichů, nebo přecházejí do rostlin. Zjednodušeně je propojenost environmentálních systémů s potravním řetězcem znázorněna na **obr. 11**. Je zde dobře patrná komplexnost osudu xenobiotických látek v životním prostředí, jejíž popis ani pochopení není triviální. Zjednodušeně lze říci, že pokud chceme studovat osud a možné interakce jedné xenobiotické látky, např. imazalilu (fungicid; struktura znázorněna na **obr. 11** žlutě), uvažujeme jeho vstup do životního prostředí jak z odpadních vod (kam se dostal jak ze zemědělské produkce, tak i v důsledku farmaceutické léčby mykóz ve veterinární péči), tak přímo během aplikace na plod v rámci jeho ochrany před houbovými onemocněními (většina aplikovaného fungicidu totiž zůstává na povrchu plodu a do půdy se dostává splachem). Toto je tedy první vstupní cesta vedoucí přes půdu. V půdě může nejen imazalil (uveden jako modelový příklad) interagovat s dalšími toxickými látkami pocházejícími z farmaceutického průmyslu nebo dalšími agrochemikáliemi (na **obr. 11** pro příklad uveden repelent kapsaicin – znázorněn bíle), dále potom s živinami, těžkými kovy (na **obr. 11** zastoupeno Cd, které může být součástí aplikovaných odpadních vod (kalů), nebo se do půdy dostává z matečné horniny, či minerálních hnojiv) a půdní biotou. Imazalil (obecně cizorodá látka) může zůstat v půdě vázán v rámci mikroedafonu, nebo sorbován na organominerální komplex, nebo se vyskytuje

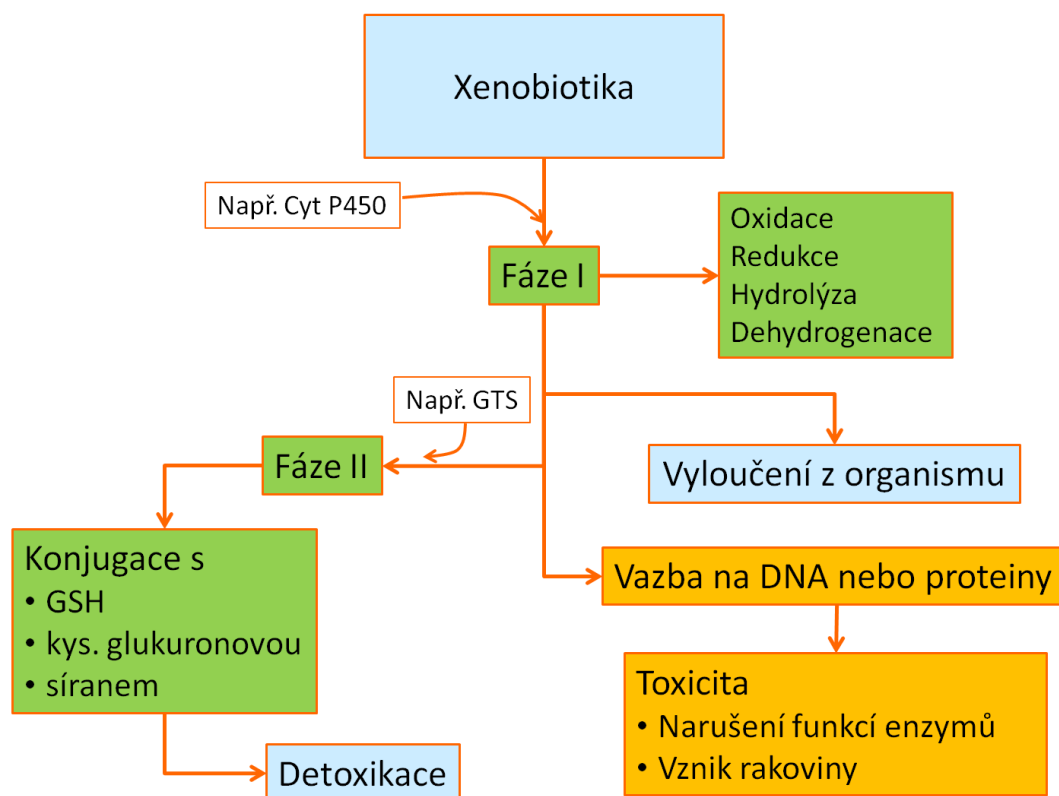
víceméně slabě vázaný na kationty nebo volný, tedy v půdním roztoku. Půdní roztok představuje poměrně mobilní část půdy, ze které rostliny přijímají živiny. Současně s živinami však do rostlin přecházejí z půdního roztoku nebo jsou i aktivně přijímány (přes buněčnou stěnu a plasmatickou membránu kořenových čepiček) i látky rizikové (více o přenosu a formách rizikových prvků v příložených publikacích (Jaklová Dytrtová *et al.* 2012b; Jaklová Dytrtová *et al.* 2011b; Jaklová Dytrtová *et al.* 2011c; Jaklová Dytrtová *et al.* 2009b; Jaklová Dytrtová *et al.* 2008). Tyto xenobiotické látky se pak dle jejich povahy distribuují v rostlinném těle. Svou roli zde hrají i ochranné mechanismy rostlin, jako je vazba těžkých kovů na tzv. fytochelatiny (což jsou malé peptidy jen o několika aminokyselinách obsahujících síru). U živočichů jsou jejich analogem metalothioneiny. Často též dochází k ukládání toxických látek do orgánů, kterých se rostlina na konci vegetačního období zbavuje; mohou to být jak listy, tak i třeba plody, anebo je umísťuje do podpůrných pletiv, kde neprobíhají významné biochemické procesy (např. borka). Do lidského potravního řetězce (na **obr. 11** v podobě jablka) se cizorodé látky dostávají především z přímé aplikace a též v důsledku detoxikačních strategií rostliny. Biotransformace probíhá především v játrech (pomocí enzymů komplexu P450), ale také v plicích, ledvinách, slezině, ve střevech, svalech i kůži, sliznici a oku v závislosti na způsobu vstupu xenobiotika do organismu a jeho distribuci (která závisí především na jeho (ne)rozpuštěnosti ve vodě a afinitě vůči některým bílkovinným přenašečům). Na úrovni buněk se dostávají z cytozolu do endoplasmatického retikula a především do mitochondrií, kde dochází k jejich enzymatické transformaci.



Obr. 11. Zjednodušený přehled možných toků toxických látek a jejich propojení s potravinovým řetězcem člověka (zdroj: autorka).

1.7 Metabolické přeměny látek

Poté, co jsou cizorodé látky přijaty a distribuovány organismem, procházejí obvykle celou řadou metabolických přeměn. Podrobně se studiem metabolických přeměn xenobiotik zabývá toxikokinetika. I poměrně bezpečné látky mohou teoreticky (v závislosti na příjmu a stavu organismu) po sledu přeměn dojít takových strukturních a funkčních změn, že se mohou stát i velmi toxickými. Z tohoto důvodu je třeba studovat nejen dané látky samotné a jejich přímé interakce v organismu, ale též jejich metabolity. Nejčastěji kaskáda biotransformací začíná v játrech za pomoci enzymatického komplexu Cyt P450 (Voet a Voet 2011) (**obr. 12**).



Obr. 12. Zjednodušené schéma metabolismu xenobiotik (upraveno a doplněno podle (Faber *et al.* 2014))

Játra obsahují mnoho enzymů, které umožňují přeměnit do těla přijatá xenobiotika (např. pesticidy, farmaka) (Meyer 1996). Není proto divu, že nepříznivé přeměny xenobiotik mají primárně hepatotoxický charakter (Antoine *et al.* 2008). Prvním krokem metabolických přeměn je tzv. metabolická fáze I, která v sobě zahrnuje řadu chemických reakcí, jako je oxidace, redukce, dehydrogenace nebo hydrolýza. Zde se uplatňuje celá řada vitamínů (B-skupiny, C, E) a antioxidantů (karotenoidy) a glutathion (GSH). Jednou z nejdůležitějších přeměn je oxidační funkcionalizace katalyzovaná enzymy Cyt P450. Vzniklé metabolity xenobiotik často obsahují hydroxylové (OH), amino- (NH₂) nebo karboxylové (COOH) funkční skupiny. Takto změněná původní xenobiotika mohou buď (i) být vyloučena z organismu, (ii) vstoupit do druhé kaskády přeměn zvané metabolická fáze II, nebo, v případě velmi reaktivních metabolitů, (iii) nevratně navázána na proteiny či dokonce na DNA (Antoine *et al.* 2008).

V metabolické fázi II dochází ke konjugaci metabolitů xenobiotik např. s GSH, kyselinou glukuronovou nebo síranem (Zimmerman 1999). Takto navázané jsou metabolity detoxifikovány a vyloučeny z organismu jako rozpustné součiny ve vodě.

Velmi reaktivní metabolity jsou pro organismus značně toxické a jejich vazbou na proteiny (zejména enzymy) mohou být blokovány nebo nějak narušeny biochemické reakce (katalyzované těmito enzymy). Nezanedbatelné je zde i riziko vzniku rakoviny v důsledku vazby reaktivních metabolitů na DNA. Jejich poločas výskytu je často méně než jedna minuta (velmi rychle reagují), proto jejich detekce v plasmě, či krvi je v podstatě nemožná (Park *et al.* 2005).

1.8 Metody studia látkových přeměn

1.8.1 Konvenční metody studia látkových přeměn

V případě možností konvenčních metod studia látkových přeměn je velmi důležitý čas, kdy je studium prováděno. S ohledem na vysokou reaktivitu některých metabolitů, a tedy krátký (polo)čas výskytu (do jedné minuty, viz předchozí kapitola), je nutné s analýzami začít prakticky okamžitě po expozici. Konvenční metody zahrnují především metody *in vitro* a *in vivo*.

In vitro metody zahrnují využití supersomů, mikrosomů, cytosolu, S9 frakce, (transgenní) buněčné linie, primárních hepatocytů, jaterních řezů a odmítnutých jater (Brandon *et al.* 2003). Cílem těchto metod je co nejpřesnější mimikování *in vivo* situací. Nespornou výhodou těchto metod je jejich soulad s etickým kodexem a to, že v porovnání s metodami *in vivo* nejsou tolik pracné.

Intaktní jaterní buňky (primární hepatocyty) jsou ideální pro studium pravděpodobného celkového reakčního obrazu přeměn xenobiotik. Na druhé straně jejich samotná izolace z jaterní tkáně je komplikovaná a pracná, navíc musí být zajištěno, že nebude jaterní tkáň dárce poškozena. Realita je v tomto případě zkrácena snížením hladin některých enzymů v důsledku nepůvodního okolí jaterních buněk. Z tohoto důvodu je výtěžek biotransformačních reakcí (konverze) snížen, často i významně (Pelkonen *et al.* 2005).

U **jaterních řezů** je spojení mezi intaktními buňkami zachováno, což je nespornou výhodou oproti předchozí metodě. Podobně jako u primárních hepatocytů je jejich získávání komplikované a pracné, dále životnost buněk v řezech je pouze několik málo dní (Brandon *et al.* 2003).

Z hlediska nejlepšího přiblížení realitě jsou z *in vitro* metod výhodné experimenty s **izolovanými perfundovanými játry** (celým orgánem). Nevýhodou je, že tento substrát lze získat pouze z animálních modelů, navíc pro každý dílčí experiment je třeba jedno zvíře (Brandon *et al.* 2003).

Nejméně populárním *in vitro* systémem jsou **jaterní buněčné linie**, a to z toho důvodu, že ne všechny enzymy z metabolické fáze I i II jsou exprimovány. Na druhé straně je možné genetickou úpravou podpořit nebo naopak potlačit patřičné metabolické dráhy, což umožňuje se selektivně zaměřit na studium jen některých parciálních enzymaticky řízených reakcí (Brandon *et al.* 2003).

Lidský jaterní cytosol je připravován centrifugací homogenizované jaterní tkáně. Vzhledem k tomu, že obsahuje především enzymy fáze II (např. glutathion-S-transferázu, N-acetyl transferázu a sulfottransferázu), je používán pro *in vitro* studie fáze II (Brandon *et al.* 2003).

S9 frakce je supernatant získaný centrifugací na 9000 × g. Obsahuje především mikrosomální i cytosolické enzymy z obou metabolických fází (tj. I i II). Nevýhodou S9 frakce je nízká enzymatická aktivita ve srovnání se samotným cytosolem nebo mikrosomy. V praxi se pro metabolické studie nejčastěji používá kombinací tří výše zmíněných metod *in vitro*; S9 frakce, lidského jaterního cytosolu a mikrosomu (Brandon *et al.* 2003).

Celkově z *in vitro* metod jsou v současné době nejpopulárnější aplikace na lidské **mikrosomy** (HLM) nebo krysí jaterní mikrosomy (RLM), které slouží ke studiu metabolické fáze I. Využití **supersomů** je podobné jako u mikrosomů, s tím rozdílem, že aktivita exprimovaných enzymatických souborů přidáním xenobiotika je vyšší (Stresser *et al.* 2013).

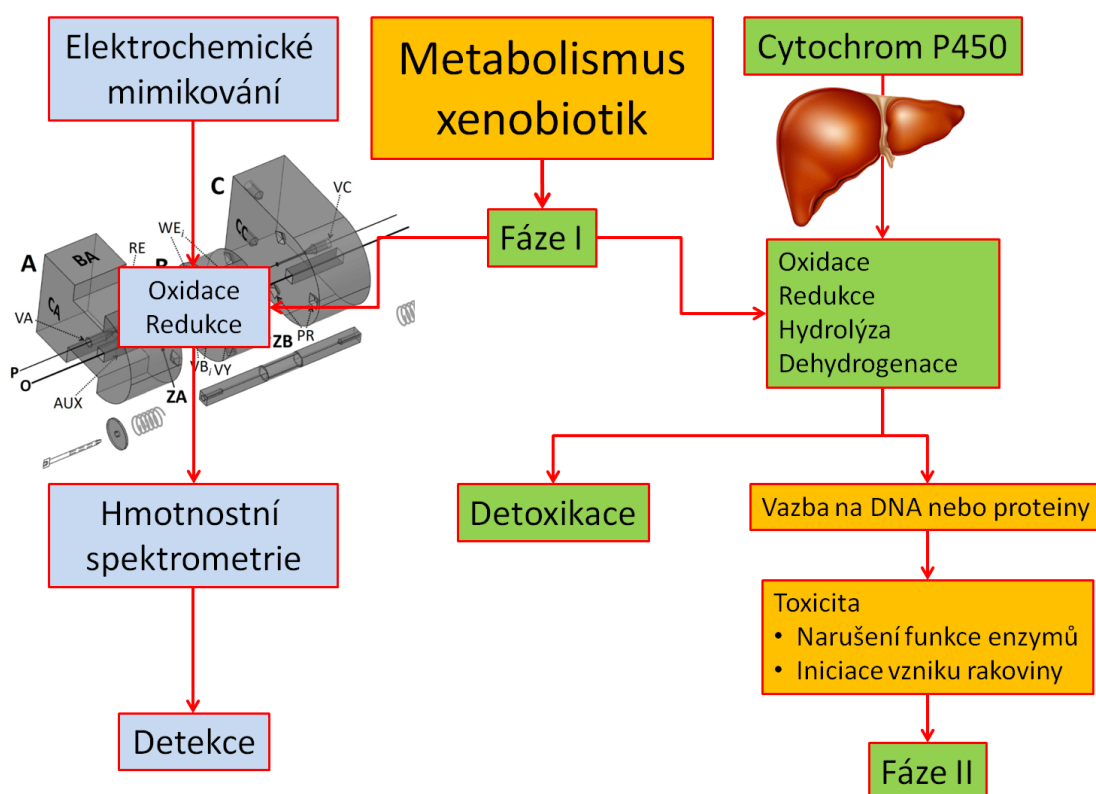
HLM sestávají z vesikulů endoplasmatického retikula jaterních buněk a obsahují především enzymy z rodiny Cyt P450 a UGT (uridine 5'-difosfo-glukuronosyltransferáza). Podobně jako cytosol a S9 frakce jsou připravovány centrifugací z jaterních preparátů. HLM umožňují studovat vliv specifických forem enzymů odpovědných za metabolické změny

pouhým přidavkem inhibitorů těchto enzymů do inkubační směsi. H(R)LM z podstaty své přípravy zvyšují aktivitu enzymů metabolické fáze I, což celkově usnadňuje práci s tímto modelem, na druhé straně tato elevace aktivity enzymů fáze I znemožňuje srovnání takto získaných výsledků s *in vivo* modely. Z tohoto důvodu jsou výsledky získané studiem H(R)LM využity pouze pro kvantitativní screening metabolitů (Brandon *et al.* 2003). V praxi se s tímto modelem pracuje tak, že jsou H(R)LM inkubovány společně s přidáním xenobiotikem 90 min v roztoku pufovaným na pH 7,4 při fyziologické teplotě (37°C). Následně je přidáno vhodné organické rozpouštědlo (např. acetonitril), aby tak byly ukončeny enzymaticky katalyzované reakce a zároveň extrahovány vzniklé metabolity z inkubačního roztoku. Takto extrahované specie metabolitů (nejedná se o samotné metabolity, protože vlivem matrice inkubačního roztoku dochází k jejich interakci a navázání na látky přítomné v matrici roztoku) jsou separovány nejčastěji pomocí kapalinové (LC) nebo vysokotlaké kapalinové chromatografie (HPLC) a následně analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie (MS). Především vzniklé reaktivní metabolity mají tendenci interagovat a tvořit kovalentní adukty s makromolekulami nebo jinými nukleofily přítomnými v inkubačním roztoku. Aby bylo možné vzniklé metabolity identifikovat (pomocí MS), je třeba předřadit separaci pomocí zvoleného typu LC (Baumann *et al.* 2010). Přídavek tzv. vychytávacího média (trapping agent), jako je např. GSH (glutathion), často umožňuje nepřímou detekci elektrofilních specií, které mohou být identifikovány na základě vzniklých předpokládaných aduktů (Lohmann a Karst 2007). Zde je nutné podotknout, že skutečně vysoce reaktivní metabolity (tedy ty potenciálně pro organismus nejvíce nebezpečné) nemohou být takto „vychytány“ buď vůbec, nebo nedostatečně efektivně, aby tak mohly být následně identifikovány a kvantifikovány. Často se jedná o metabolity silně interagující např. s proteiny (Baillie 2006).

Vzhledem k těmto nevýhodám a také k tomu, že legislativa Evropské unie neumožňuje testovat potenciální toxicitu např. kosmetických přípravků na modelech pocházejících ze zvířecích modelů, je třeba hledat jiné alternativní přístupy (EU 2009). Vzhledem k tomu, že se každý biologický materiál využitý k *in-vitro* stanovení produktů (metabolitů) enzymatických přeměn může lišit jak výtěžkem, tak i samotnými produkty, a tedy srovnání s modely *in-vivo* je nedostatečné, mohly by být skutečným kandidátem metody instrumentální. Tyto metody jsou obecně lépe reprodukovatelné než metody biologické a navíc zde není kolize s etickým kodexem.

1.8.2 Mimikování metabolických změn pomocí elektrochemie

V roce 1981 byl poprvé rozpoznán potenciál elektrochemické oxidace pro syntézu metabolitu ve fázi I (obr. 13). Takto bylo možné elektrochemicky generovat N-dealkylované specie čtyř neurofarmak bez jakéhokoli přídavku chemických reagentů, či enzymů (Shono *et al.* 1981).



Obr. 13. Schéma znázorňující možnosti elektrochemie mimikovat první fázi detoxikace xenobiotických látek (zdroj: autorka).

V současné chvíli je na trhu k dispozici několik elektrochemických cel použitelných pro metabolické studie, ne všechny je ovšem možné *on-line* zapojit před hmotnostní spektrometr s ionizací elektrosprejem. Tyto cely se objevily prakticky zároveň, přičemž elektrochemická cela popisovaná v této práci byla v době, kdy byly tyto cely zpřístupněny, patentována v České republice. Došlo tedy k současnému vývoji metabolických elektrochemických cel. Je však nutno zmínit, že se cely vzájemně velmi liší, a to jak

konstrukcí, uspořádáním elektrod, tak i druhem pracovních elektrod, lze tedy vyloučit vzájemné „kopírování“ konstrukčních řešení mezi autory. Nákresy různých komerčních cel lze najít např. ve (Faber *et al.* 2014). Následující kapitola se pokusí shrnout a nastínit problematiku konstrukce elektrochemických cel zapojitelných před hmotnostní spektrometr (zkrácený popis elektrochemické cely navržené a vyvinuté autorkou je uveden v metodách práce). Tomu, že se nejedná o jednoduchou záležitost, napovídá i to, že se o různá řešení výzkumníci pokoušeli již od 70. let minulého století.

1.8.3 *On-line* spojení elektrochemických metod s hmotnostní spektrometrií

Vzhledem k tomu, že *on-line* spojení elektrochemie s hmotnostní spektrometrií zažívá v současné době renesanci (první pokusy byly prováděny již v 70. letech minulého století (Bruckenstein a Comeau 1973; Bruckenstein a Gadde 1971)) a přední výrobci zaměřující se především na vývoj a prodej hmotnostních spektrometrů v současnosti zavádějí na trh jako horké novinky právě hmotnostní spektrometry vybavené elektrochemickou celou, rychle narůstá řada různých technických řešení vylepšujících toto spojení. Nárůst zájmu v posledních 15 letech lze přisuzovat především zavedení výhodného způsobu ionizace vzorku (ESI (Gun *et al.* 2010)). *On-line* spojení EC/ESI-MS již ke konci 90. let minulého století testovali např. (Deng a Van Berkel 1999a; Deng a Van Berkel 1999b; Zhou a Van Berkel 1995).

Zde je nutné zmínit, že elektrochemie je prováděna v roztoku, přičemž v hmotnostní spektrometrii před vlastní separací podle m/z a detekcí dochází k převodu z kapalně fáze do fáze plynné. Zmíněný přechod je mimo jiné závislý na množství přiváděného vzorku (Jaklová Dyrtrtová *et al.* 2012a). Jedná se tedy, v případě, že nechceme konstrukčně zasahovat do sestavy hmotnostního spektrometru, o limitní a určující parametr, kterému je třeba přizpůsobit nastavení elektrochemické metody a též konstrukci cely. Dále je třeba se vypořádat s vhodným elektrolytem pro EC a přítomnými solemi tak, aby nebyla narušena funkčnost MS (suprese signálu, koroze). Nezanedbatelným faktorem je správná volba rozpouštědla, vhodného pro celý systém.

1.8.3.1 Výhody plynoucí ze spojení elektrochemie s hmotnostní spektrometrií

Navzdory velké oblíbenosti hmotnostní spektrometrie (zvláště ESI-MS) je stanovení, či studium látek již slabě polárních téměř nemožné, stejně jako studium látek přítomných v různých speciích (v biologických matricích) bez předchozí separace. Právě tato dvě analytická omezení lze řešit spojením EC-metod s MS.

O tom, že detekce/stanovení nepolárních látek pomocí ESI-MS je stále velkým problémem, svědčí i několik publikací zabývajících se různými způsoby „navázání“ nepolárních látek na polární nosič. Např. Jin a kol. (Jin *et al.* 2011) pro charakterizaci lipidů a některých sterolů pomocí ESI-MS provedli jejich „polarizaci“ pomocí laserem indukované akustické desorpce (angl. Laser-Induced Acoustic Desorption) kombinované s klasterizací pomocí $\text{ClMn}(\text{H}_2\text{O})^+$ a chemickou ionizací. Dalším přístupem, jak detekovat nepolární látky pomocí MS, je například využití kombinace s laserovou ionizací za spoluúčasti matrice (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization; MALDI) (Macha *et al.* 2001), tento postup je však vhodný především pro polymery.

Ionizace nepolárních látek spočívá v předřazené oxidaci či redukci látky, anebo její navázání na ion generovaný na pracovní elektrodě (dále v textu jako elektrochemická aktivace), tedy spojení EC/MS. Díky velké variabilitě elektrochemických metod (Wang 2006) je možné danou použitou metodu, či elektrochemickou celu přímo modifikovat, aby vyhovovala řešení pro daný analytický problém. Plattner a kol. (Plattner *et al.* 2012) použili ke stanovení kovalentních aduktů nukleových kyselin elektrochemickou aktivací (ve smyslu reakce s nabitou částicí), která byla předřazena následné separaci pomocí kapalinové chromatografie (LC) s detekcí MS. Elektrochemickou aktivaci studované látky ve spojení s LC-MS lze využít např. pro detekci metabolitů kůže (Melles *et al.* 2013). Zmíněné přístupy tedy zahrnují nejprve elektrochemickou aktivaci studované látky, následně separaci pomocí LC a detekci MS, tedy EC-LC-MS. Další možností je nejprve využít separaci LC, po níž následuje elektrochemická aktivace a MS detekce/stanovení, tj. LC-EC-MS. Zmíněného přístupu bylo využito při stanovení isokyanátů (což jsou prudce jedovaté látky používané při výrobě některých pesticidů, které též způsobují hypersenzitivitu plic) a příbuzných nepolárních látek, kdy jeho elektrochemická aktivace pomocí ferrocenoyl piperazidu byla provedena až po separaci LC (Seiwert *et al.* 2004), analogicky byly tímto spojením studovány polyhydroxylové antioxidanty (Zettersten *et al.* 2009).

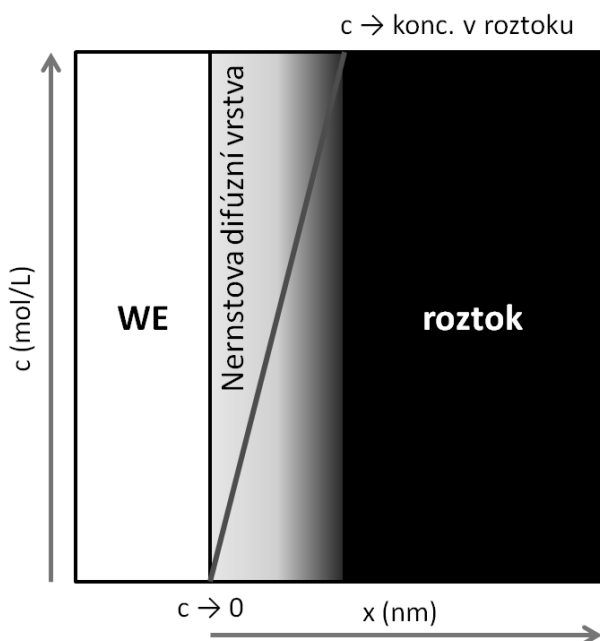
Při použití navržené EC s generováním iontů je teoreticky možné urychlit analýzu vyloučením separačního kroku pomocí LC, neboť dochází elektrochemickou cestou k tzv. vyvázání látky z komplikované matrice vzorku. Je možné jej použít pro selektivní, citlivé a časově nenáročné stanovení pesticidů přímo v matrici půdního roztoku bez jakékoli předchozí úpravy vzorku (Jaklová Dytrtová *et al.* 2013). Princip metody je založen na vysoké afinitě látky ke generovanému iontu (např. iontům Cu^+ a Cu^{2+}). V uvedené studii bylo využito dvouelektrodového zapojení průtokové elektrochemické cely. Toto zapojení je sice velmi jednoduché, nicméně je zatíženo nižší robustností, nižší spolehlivostí a vyšší náchylností k poskytování podhodnocených či nadhodnocených výsledků a v extrémních případech nedochází ke generaci požadovaných iontů (látek) vůbec, protože u tohoto druhu zapojení elektrod není možné zajistit přesné dosažení a stálost požadovaného vkládaného potenciálu.

V neposlední řadě se *on-line* spojení EC-ESI-MS dá využít ke studiu mechanismů elektrochemických reakcí, a to včetně některých metabolických přeměn (uvedeno výše).

1.8.3.2 Elektrochemie v průtoku

Základním požadavkem pro dobrou, nejlépe úplnou konverzi analytu na pracovní elektrodě je minimalizace tzv. Nernstovy difúzní vrstvy, která se tvoří při difúzně řízeném ději (tedy závislém na koncentraci a difúzním koeficientu dané látky). Problematika vytvoření Nernstovy difúzní vrstvy spočívá ve vytvoření zpravidla několik nm silné oblasti obklopující pracovní elektrodu (WE) v důsledku odčerpávání iontů analytu z nejbližšího prostoru WE a jejich následné konverzi na WE (**obr. 14**). V oblasti Nernstovy difúzní vrstvy tedy dojde k lineární distribuci analytu (směrnicí je difúzní koeficient látky), kdy u těla WE se koncentrace analytu limitně blíží nule a na okraji Nernstovy difúzní vrstvy dosahuje hodnot koncentrace analytu v roztoku (tzv. bulk concentration). Pokud dojde k vyčerpání analytu v těsné blízkosti WE a analyt putuje k WE pouze rychlostí danou jeho difúzním koeficientem a další procesy již rychlost přeměny analytu na WE nesnižují, hovoříme o tzv. difúzně řízeném procesu. Často lze těchto dějů využít ke studiu fyzikálně-chemických vlastností systému (Samec 2012; Senda *et al.* 1991), nicméně pro úplnou konverzi analytu na WE v nějakém reálném čase se jedná o jevy nežádoucí, které se snažíme v různé míře eliminovat. Eliminování vzniku Nernstovy difúzní vrstvy lze docílit dostatečným mícháním analyzovaného

roztoku. Míchání může být zajištěno buď mechanickým mícháním roztoku, nebo vznikem turbulencí překročením Reynoldsova čísla pro vyšší rychlosti průtoku. Laminární proudění neumožňuje efektivně narušit vznik Nernstovy difúzní vrstvy. V hodnocení (výpočtu) Reynoldsova čísla je třeba brát v úvahu jak rychlost proudění, tak průměr kapiláry.

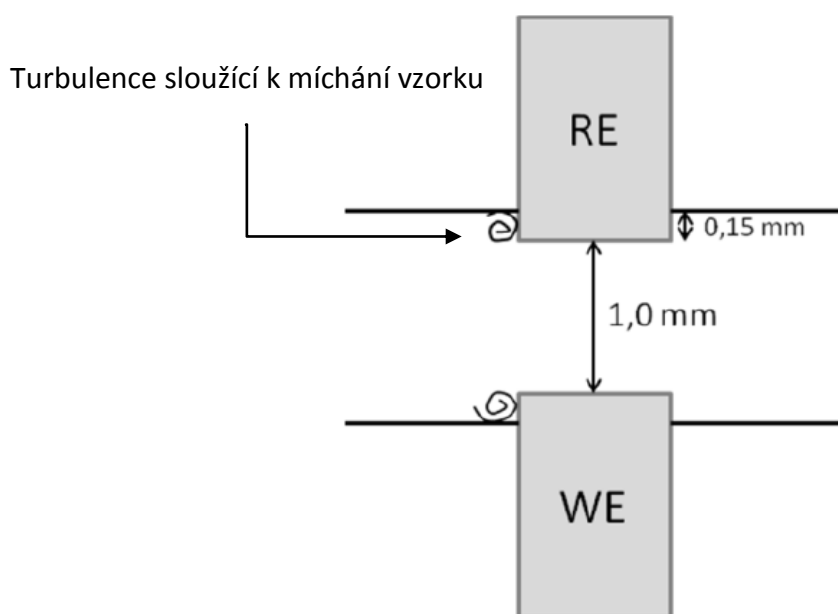


Obr. 14. Schematické znázornění lineární distribuce analytu v blízkosti (μm) pracovní elektrody (WE); v těsné blízkosti WE se koncentrace analytu limitně blíží nule, na okraji Nernstovy difúzní vrstvy je koncentrace analytu stejná jako ve zbytku roztoku (zdroj: autorka).

Průměry kapilár využívané pro přívod vzorku k hmotnostnímu spektrometru mají zpravidla průměr 0,25 mm (samozřejmě i jiné průměry jsou možné), přičemž průtoky vzorku v těchto kapilárách se pohybují v rozmezí 0,3 až 1 mL hod^{-1} . Při takto nízkém průtoku nabývá tloušťka hydrodynamické hraniční vrstvy mikrometrových rozměrů (Gunasingham a Fleet 1983).

Při průměru kapilár 0,25 mm dané hodnoty průtoků nestačí k vytvoření turbulentního míchání vzorku. Tento problém lze v principu řešit několika způsoby: (i) zvětšením průměru kapilár, což však povede k neúměrnému a nežádoucímu zvětšení spotřeby vzorku a nedostatečné konverzi, (ii) zvětšením průtoku vzorku, což však povede opět k neúměrné

spotřebě vzorku, oboje je provázené zahlcením iontového zdroje hmotnostního spektrometru. Další možností je (iii) umístění do těla voltametrické cely, případně do přívodní kapiláry, míchací zařízení. Nicméně umístění míchacího zařízení do miniaturizované cely s sebou přináší nemalé konstrukční výzvy. Poměrně elegantním a jednoduchým řešením může být (iv) vytvoření turbulentního proudění uvnitř elektrochemické cely vytvořením dostatečné povrchové nerovnosti. Tohoto řešení bylo využito např. u dvouelektrodové cely o vnitřním objemu 0,72 μL povysunutím elektrod o 0,15 mm do proudícího roztoku (Jaklová Dyrťová *et al.* 2012a) (**obr. 15**). V neposlední řadě je možné (v) vytvořit různé typy odděleného dávkování vzorku pro voltametrii i hmotnostní spektrometrii umístěním rozdělovacích ventilů (Jaklová Dyrťová *et al.* 2015).



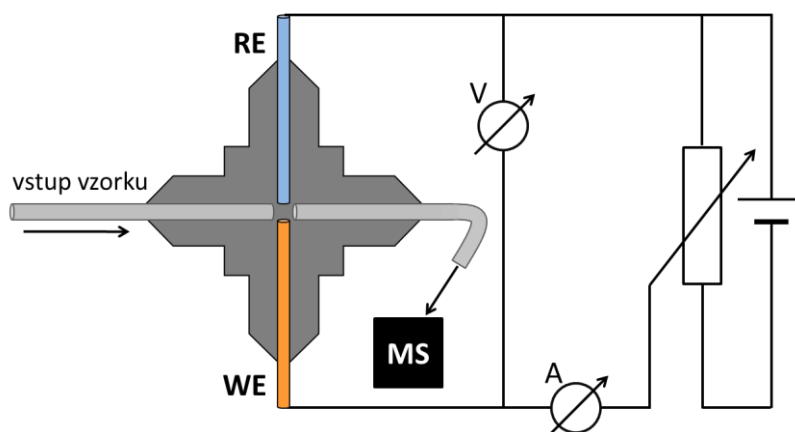
Obr. 15. Schématické znázornění konstrukčního řešení u dvouelektrodového uspořádání způsobujícího turbulentní míchání vzorku pro minimalizaci tloušťky Nernstovy vrstvy; RE – referentní elektroda, WE – pracovní elektroda (zdroj: autorka).

1.8.3.3 Elektrochemické cely

Za téměř čtyři dekády uplynulých let pokusů o spojení EC/MS bylo vyvinuto nespočet variant průtokových elektrochemických cel. Z hlediska zapojení potenciostatu lze tyto cely dělit na tříelektrodové a dvouelektrodové. Konstrukčně jsou dvouelektrodové cely jednodušší, obsahují pouze WE a elektrodu referentní (RE). V tomto uspořádání elektrický

proud protéká mezi WE a RE, proto je obtížné mezi ně vkládat fixní potenciál. Pro udržení konkrétní hodnoty potenciálu je mnohem výhodnější tříelektrodové uspořádání, kdy elektrický proud protéká mezi WE a elektrodou pomocnou (AE), přičemž RE slouží k určení nebo vložení potenciálu mezi WE a RE.

Konstrukce průtokových cel (Economou 2010) se často zcela liší od „klasických“ neprůtokových (Tur'yan 1997) cel, z hlediska velikosti a tvarové rozmanitosti cel jsou pak varianty nepřeborné. Např. Shono *et al.* (Shono *et al.* 1981) zkonstruovali celu o vnitřním objemu 50 mL (!), ve které generovali N-dealkylované specie čtyř neurofarmak bez použití jakékoli další chemikálie, což je jeden z příkladů využití EC/MS spojení k mimikování metabolické oxidace (viz dále). Obecně jsou však cely určené pro *on-line* spojení EC/MS spíše miniaturizované. Elektrochemické cely s miniaturizovanými vnitřními rozměry lépe vyhovují běžně používaným průtokům v MS (~ mL/hod), stejně tak splňují nároky na minimalizaci spotřeby vzorku (van den Brink *et al.* 2015). Vnitřní průměr cely by ideálně neměl být větší, než je průměr použitých kapilár, aby se předešlo vytváření mrtvých objemů. Mrtvý objem by celou analýzu zpomaloval a zároveň by docházelo k tzv. rozmývání zón elektrochemického značení (viz dále). Požadavek na miniaturizaci elektrochemické cely lze snáze technicky docílit pro dvuelektrodové zapojení potenciostatu. V tomto případě je možné využít například komerčně dostupný PEEK Cross (**obr. 16**), který má vnitřní rozměry stejné jako běžně používané kapiláry a je s nimi plně kompatibilní a běžně slouží k jejich propojení.



Obr. 16. Příklad zapojení elektrochemické cely uzpůsobené z běžně dostupného PEEK Cross pro dvuelektrodové zapojení potenciostatu, RE – referentní elektroda, WE – pracovní elektroda, MS – hmotnostní spektrometr (zdroj: autorka).

Tohoto typu konstrukce bylo využito např. k elektrochemickému značení tebukonazolu pomocí nascentních kationtů mědi (Jaklová Dyrtrtová *et al.* 2013). Nevýhodou této jinak konstrukčně velmi jednoduché cely je její nižší robustnost, což je pro dvouelektrodové zapojení zřejmé. Robustnost tohoto řešení je navíc snížena nemožností použít běžné referentní elektrody druhého druhu. Sestava je v tomto případě tvořena Cu drátkem (WE) a protielektrodou Ag drátkem – elektrodou pseudoreferentní (pREF). Tento systém je schopen vložený potenciál na WE udržet pouze omezenou dobu (řádové jednotky minut dle velikosti vloženého potenciálu), poté nutně dochází k samovolnému přepólování systému, tj. WE se stává Ag elektroda. V systému se to projeví tak, že místo generování Cu kationtů dojde ke generování Ag kationtů.

Analyticky robustnější je tříelektrodové zapojení potenciostatu, toto zapojení díky použití AE a běžné RE již splňuje nároky na stabilní kontrolovatelné držení potenciálu. Avšak nutnost miniaturizace RE s sebou nese i nemalé konstrukční výzvy (viz typy elektrod).

1.8.3.4 Typy elektrod

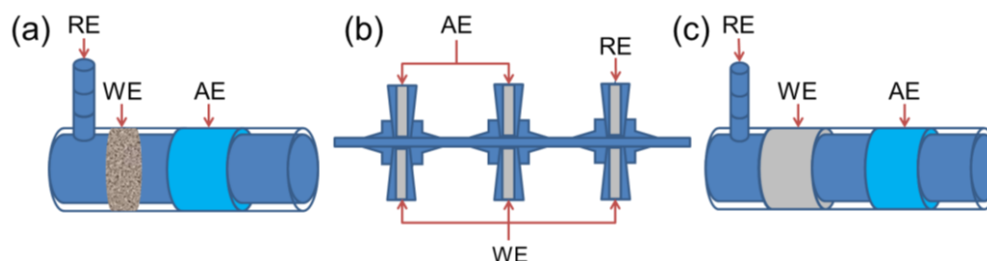
Pro AE (pomocné elektrody) je výběr materiálů omezen pouze na nepolarizovatelné; AE nesmí ovlivňovat chování WE. Nejčastější AE pro spojení EC/MS jsou z nerezové oceli, grafitem dopovaného teflonu, platiny, či paladia (Acworth a Bowers 1997).

Použitelné RE (referentní elektrody) jsou typově stejné jako používané při průtokových měřeních, ale musí být miniaturizované a nesmí obsahovat příliš velké mrtvé objemy. Klasická Ag/AgCl (argentchloridová) referentní elektroda může být použita jen v poměrně konstrukčně náročném uspořádání v amperometrické (coulometrické) cele, v poměrně velké vzdálenosti od pracovní elektrody (Acworth a Bowers 1997). Ag/AgCl může být použita v miniaturizované podobě, přičemž běžně používaný KCl je nahrazen NH₄Cl (Jaklová Dyrtrtová *et al.* 2015), který je pro použití v EC/MS výhodnější, neboť je kompatibilní s často používaným základním elektrolytem pro spojení EC/MS, tj. CH₃COONH₄. NH₄Cl také nevnaší do systému nežadoucí K⁺ kationty, které mají tendenci se vázat na analyt. Nevýhodou argentchloridové RE (zvláště té miniaturizované) je nutná poměrně častá údržba. Další vhodnou RE je Pd/H₂, která má tu výhodu, že je téměř bezúdržbová a je možné s ní pracovat i za zvýšeného tlaku; nevýhodou je, že její potenciál je závislý na pH (Acworth a

Bowers 1997). Teoreticky je možné použít i Hg/Hg₂Cl₂ (kalomelovou) RE, jejíž potenciál závisí na koncentraci protiiontu, nicméně obecně stále menší obliba rtuti a navíc nutnost použít skutečně toxické soli rtuti činí tuto RE stále méně používanou.

Výběr RE a AE je sice omezen, ale výběr WE (pracovních elektrod) použitelných v průtoku je pestrý; mohou přicházet v úvahu stále nové a všechny dosud známé použitelné materiály, mimo kapalnou rtuť. Důležitý je účel, pro který je elektrochemická cela konstruována. Stříbro, či měď, jsou vhodné pro elektrochemickou aktivaci nepolárního analytu, či separaci analytu z matrice (Jaklová Dyrtrtová *et al.* 2013; Makrlík *et al.* 2015), platina nebo zlato jsou vhodné pro redukci analytu v případě studia (mimikování) metabolických přeměn analytu. Pro oxidaci analytu lze použít skelný uhlík (glassy carbon), či jeho modifikace (Cox *et al.* 1996; Deng a Van Berkel 1999b). Dále je v environmentální analýze možné v průtoku použít např. uhlíkovou pastu, pevný amalgam, borem dopovaný diamant, či další kompozity v různých modifikacích (Barek *et al.* 2007; Bruins 2015; McCreery 2008; Navrátil a Barek 2009).

Miniaturizace elektrod pro EC je z konstrukčního hlediska poměrně nelehká pro argentchloridové RE. Miniaturizace AE je snadná a spočívá většinou v zavedení požadované plochy AE do průtoku. Miniaturizace WE s sebou přináší nutnost řešení tzv. minimax problému, tj. pro úspěšnou (dostatečnou) přeměnu analytu je třeba dostatečná, relativně velká kontaktní plocha WE, ale pro miniaturizované elektrochemické cely je i velikost WE omezena. Řešení toho problému může být použití porézních WE (**obr. 17a**), které i přes svou malou velikost mají obrovský povrch (Acworth a Bowers 1997). Dále je pro zvýšení povrchu WE možno použít sadu několika drátkových elektrod, které jsou však zapojeny jako jedna WE (**obr. 17b**), či může jako WE sloužit závit z příslušného kovu (**obr. 17c**).

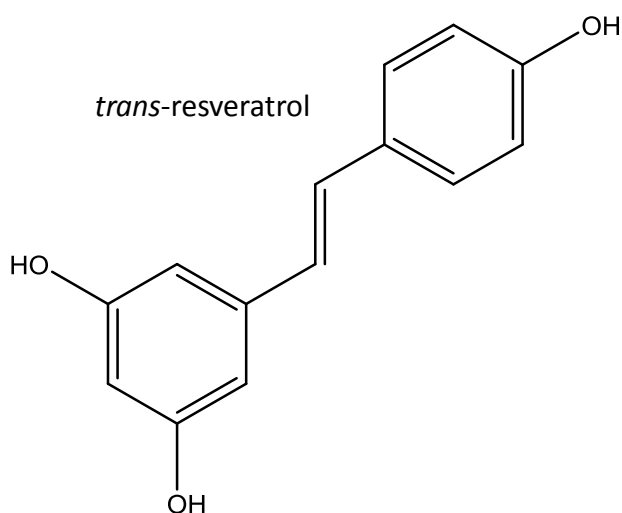


Obr. 17. Ukázky možností konstrukce elektrochemických průtokových cel pro tříelektrodové zapojení potenciostatu v závislosti na charakteru pracovní elektrody (WE); AE – elektroda pomocná, RE – elektroda referentní (zdroj: autorka).

1.9 Vybrané biologicky aktivní látky a jejich vlastnosti

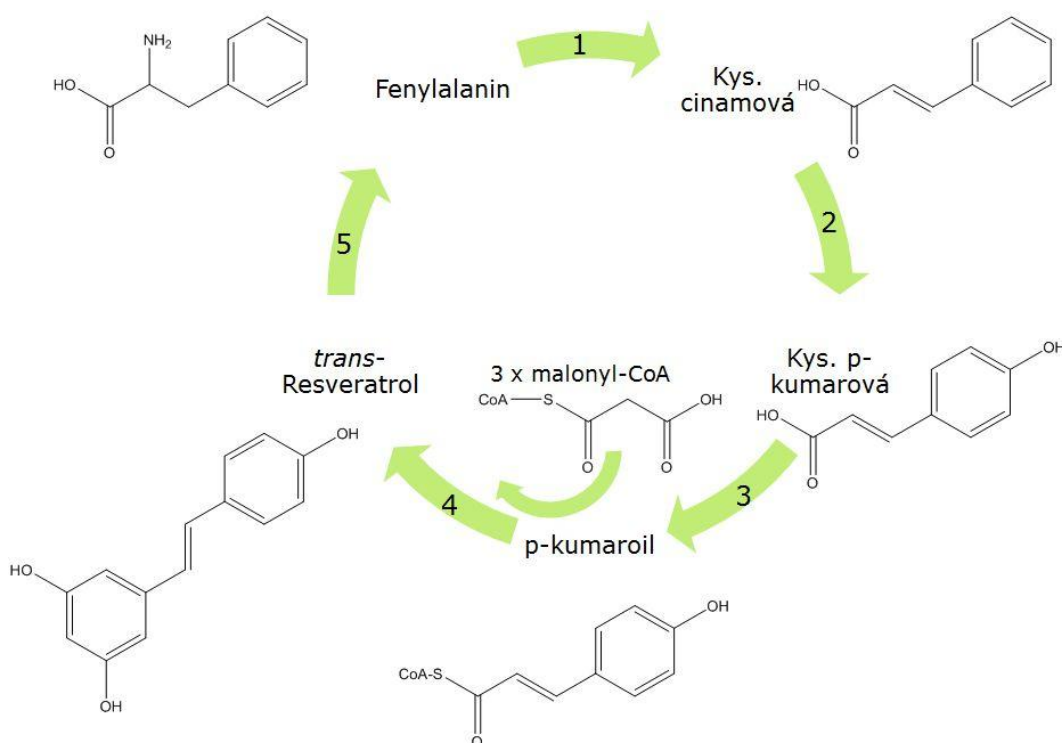
Následující pasáž se zabývá popisem vlastností několika látek s biologickou aktivitou. Největší pozornost je věnována resveratrolu – velmi populární a diskutované molekule, u níž se předpokládá významný antioxidační (i jiný pozitivní) účinek na lidské zdraví, i když jak je možno dočíst se dále, není její účinek až tak jednoznačně pozitivní. Resveratrol se vyskytuje především ve víně, proto další látkou s biologickou aktivitou, které je zde věnována pozornost je fungicid tebukonazol, který se při pěstování vinné révy celosvětově využívá k ochraně proti plísňovým onemocněním, je tedy v nezanedbatelných koncentracích přítomen ve víně též. V případové studii je pozornost vzájemným interakcím resveratrolu a tebukonazolu. Další nedílnou složkou vína je měďnatý kation, jehož zdrojem je především viniční půda, která obsahuje, díky po několik staletí využívanému síranu měďnatému proti houbovým onemocněním, velké koncentrace. Z důvodů aplikovatelnosti elektrochemické cely v proteomice je pozornost věnována též thiramu, což je látka obsahující disulfidovou vazbu, kterou je možné elektrochemicky redukovat (podobně jako u proteinů obsahujících stericky přístupnou disulfidovou vazbu). Thiram je též fungicid a repelent využívaný v zemědělství, ale také jako léčivo pro léčbu kožních mykóz.

1.9.1 Resveratrol



Obr. 18. Chemická struktura *trans*-resveratrolu.

Resveratrol (**Res**; 3,4',5-trihydroxystilben, **obr. 18**) je sekundární metabolit produkovaný nemnohými rostlinnými druhy (např. červená vinná réva, brusnice borůvka, černý rybíz, podzemnice olejná aj.) (Langcake a Pryce 1977). **Obr. 19** znázorňuje zjednodušenou biosyntézu **Res** probíhající v některých rostlinách. V rostlinách se **Res** často vyskytuje jako trans-resveratrol-3-β-D-glukosid, též zvaný jako piceid (Romero-Perez *et al.* 1999). **Res** byl poprvé izolován v roce 1940 z kořene divizny velkokvěté (*Veratrum grandiflorum* O. Loes).



Obr. 19. Biosyntéza resveratrolu v rostlinách **1** – Fenylalanin amonium lyasa, **2** – Cinamát 4-hydroxylasa, **3** – 4-coumarát: CoA ligasa, **5** – stilben syntax, upraveno podle (Langcake a Pryce 1977)

Řada vědeckých studií (např. (Delmas *et al.* 2005; Delmas *et al.* 2006)) dokládá, že **Res** je účinnou látkou v prevenci kardiovaskulárních chorob, rakoviny, neurodegenerativních procesů i virových infekcí. Tyto práce dokládají účinnost **Res** na molekulární i buněčné úrovni. Nicméně **Res** je znám svou velmi nízkou biodostupností a rychlým vymizením z metabolické cirkulace, a to zejména díky jeho nižší rozpustnosti ve vodě a vysoké reaktivitě (schopnosti interagovat s přítomnými látkami). Většina metabolických přeměn **Res** probíhá na jedné (nebo více) hydroxylových skupinách. Mezi nejčastější metabolity patří zejména

sloučenina s glukuronidem a adukty sulfátu. Dokonce některé sulfáty **Res** byly uměle syntetizovány a testovány na jejich protirakovinné působení.

Příjem **Res**, jeho osud v buňce a stabilita jeho metabolitů ještě vyžadují podrobnější prozkoumání, aby byla plně pochopena jeho biologická aktivita a bylo možno jej plně využít pro potřeby suplementace a léčby.

Velmi diskutovaný je orální příjem **Res** a jeho stabilita v lidském těle. V příjmu a stabilitě **Res** hrají významnou roli jeho biofyzikální parametry, reaktivita a také parametry aktuálního prostředí (např. pokud je pH prostředí vyšší než pK_a **Res** (8,8; 9,8, 11,4 (Lopez-Nicolas a Garcia-Carmona 2008)), tak se výrazně snižuje biologická aktivita **Res** (Lopez-Nicolas *et al.* 2006)).

1.9.1.1 Rozpustnost a absorpce resveratrolu

Úvodem je nutno podotknout, že rozpustnost **Res** ve vodě je obecně nízká (30 mg L^{-1}) a špatně prostudovaná (Belguendouz *et al.* 1997). Právě jeho charakter rozpustnosti (nebo spíše nerozpustnosti) ve vodných (polárních) rozpouštědlech ovlivňuje jeho chování a distribuci v lidském organismu. Pro zvýšení rozpustnosti **Res** se využívá (i) přídavku ethanolu, kde je jeho rozpustnost 50 g L^{-1} , tj. více jak 1000x vyšší než ve vodě. Na druhé straně přídavek ethanolu do buněčných rakovinných kultur snižuje antiproliferační účinek **Res** (Delmas *et al.* 2000). (ii) Další možností, jak zvýšit rozpustnost **Res** ve vodě, je např. přídavek DMSO (Delmas *et al.* 2000), kde se jeho rozpustnost zvýší na 16 g L^{-1} . (iii) Nebo je možné využít různých vektorů, které s **Res** tvoří komplex, např. cyklodextrinů, které tvoří inkluzní komplexy s většinou organických látek (Laza-Knoerr *et al.* 2010). (iv) Případně je vodo- propustnost **Res** vyšší po jeho navázání na nějakou bílkovinu, např. lidský sérum albumin (HSA). (v) Často se také pro zvýšení rozpustnosti **Res** využívá acetylace, jež by neměla ovlivnit jeho biologickou aktivitu (Colin *et al.* 2009; Laza-Knoerr *et al.* 2010; Marel *et al.* 2008).

Ve střevech je absorpce **Res** řízena pasivní difúzí nebo se tvoří komplexy s membránovými přenašeči (například integriny) (Delmas *et al.* 2011). Nejčastěji se **Res** v krevním řečišti nachází buď vázaný na sérum albumin nebo na lipoproteiny (Urpi-Sarda *et al.* 2005; Urpi-Sarda *et al.* 2007), či ve formě glukuronidu nebo jako sulfát. **Res** vázaný na sérum albumin nebo lipoproteiny se někdy označuje jako „volný“, protože k rozpadu tohoto

komplexu dochází na buněčné membráně. Přechod **Res** před buněčnou membránu již je spontánní proces díky lipofilnímu charakteru **Res**, protože dochází k snadné asociaci **Res** s mastnými kyselinami fosfolipidů tvořících membránu (Jannin *et al.* 2004).

1.9.1.2 *Trans/cis izomerizace a jiné deriváty resveratrolu*

Často je diskutováno, že *cis* a *trans* izomery **Res** mají jinou biologickou aktivitu (Basly *et al.* 2000; Campos-Toimil *et al.* 2007; Mazue *et al.* 2010; Orallo 2006; Yanez *et al.* 2006). Faktem je, že v potravinách se přirozeně vyskytují obě izomerní formy **Res**, přičemž *trans-Res* je zastoupen častěji a je také stabilnější. Přeměna z formy *trans* na *cis* může probíhat například účinky UV záření (Camont *et al.* 2009) anebo i viditelného světla (Chen *et al.* 2007). Konkrétní izomerní přesmyk způsobují vlnové délky 366 nm (Basly *et al.* 2000) a 254 nm (Blache *et al.* 1997). Tyto fyzikálně chemické studie jsou podpořeny nálezem obou izomerních variant (tedy *cis* i *trans*) metabolitů **Res** např. v moči.

1.9.1.3 *Významné interakce resveratrolu*

Zde jsou stručně shrnuty nejvýznamnější interakce **Res**, které byly dosud popsány z *in vivo* a *in vitro* studií, i pomocí výpočetní chemie. Tato část má zejména sloužit pro srovnání s případovou studií.

Res patří mezi polyhydroxylové látky, které, jak název napovídá, obsahují více než jeden aromatický kruh. U **Res** jsou to dva fenoly, s delokalizovanými π -elektrony, tedy obsahuje dvě velmi stabilní aromatická centra – dvě benzenová jádra. Jedno z jader obsahuje dvě hydroxylové skupiny, druhé jednu skupinu, proto mluvíme o (poly)hydroxylech (nebo častěji nesprávně polyfenolech). Přítomnost hydroxylových skupin je důvodem vysoké reaktivity **Res**. Oba fenoly jsou spojeny prostřednictvím ethylenu dvojnou vazbou, která umožňuje vznik dvou izomerních uspořádání (*cis* nebo *trans*).

Res obsahuje dvě planární centra, nicméně bylo vypočítáno (Mikulski *et al.* 2014), že tato dvě planární centra k sobě mohou být orientována různě, tedy molekula **Res** není většinou planární jako celek, ale oba fenoly jsou k sobě natočeny.

Mezi nejčastější interakce **Res** patří jak interkalace, tak i protonace nebo deprotonace hydroxylových skupin. Interkalace je nejčastěji popisovaná v souvislosti s interakcí **Res** s DNA nebo RNA a je jedním z důvodů, proč se předpokládá, že **Res** inhibuje transkripci DNA u rakovinných buněk (Brana *et al.* 2001), ale naopak může být i důvodem, proč je za určitých podmínek **Res** škodlivý (více v následující kapitole). Interkalace **Res** do DNA je umožněna díky přítomnosti π -elektronů v obou strukturách, dochází tak k tzv. π - π „štosovací“ (stacking) interakci (Mikulski *et al.* 2014), kdy je **Res** vmezeřen jedním fenolem mezi dva po sobě jdoucí nukleotidy (konkrétně mezi planární, aromatickou část purinových nebo pyrimidinových bází, které také obsahují π -elektrony, a tím umožňují vzájemnou π - π interakci). V řetězci DNA jsou nukleotidy uspořádány tak, že jejich pyrimidinové a purinové části nad sebou „leží“ jako mince narovnané na sebe, avšak nikoli těsně (i když mezi nimi též dochází k π - π interakci), je tedy umožněno, aby se planární látky (nebo jejich části) interkalovaly mezi ně.

Výpočet interkalačních interakcí není zcela jednoduchý, protože interkalace je založena na právě disperzních π - π interakcích, které se pro často využívanou metodu teoretického výpočtu DFT (density functional theory) zanedbávají. Pro výpočet interkalace je tedy nutné disperzní vazebné síly zohlednit (Elstner *et al.* 2001). Interkalacemi v biologických systémech se zabývají některé práce (Catak *et al.* 2010; Gervasio *et al.* 2000), přičemž nejvíce byl prostudován systém interakce dvou benzenů tvořících dimer (Lee *et al.* 2007; Sherrill 2013). Obecně tedy mohou nastat tři varianty konfigurace potenciální energie π - π stacking interakce dvou planárních molekul s delokalizovanými elektrony (které jsou představitelné i intuitivně): (i) paralelní uspořádání (parallel-displaced), tedy, že jeden kruh je vtěsnaný paralelně mezi ostatní, (ii) kolmé uspořádání (T-shaped), kdy rovina jednoho kruhu je uspořádána kolmo na rovinu ostatních kruhů, nebo (iii) sendvičové uspořádání (sandwich) všech kruhů.

Výpočty zabývající se konkrétně interakcí **Res** s nukleosidy odhalily (Mikulski *et al.* 2014), že energeticky nejvýhodnější je právě sendvičová interakce, přičemž je nutno brát v úvahu poměrně snadnou polarizovatelnost **Res**, která dosahovala pro různé nukleosidy hodnot 17,6 až 26,9 kcal mol⁻¹. Dále bylo zjištěno ve výše zmíněné studii, že zmíněná sendvičová interakce je pro **Res** s nukleosidy silnější ve vakuu, ale ve vodě je oslabena tvorbou vodíkových můstků. Nicméně v případě, že je v systému kromě **Res** a nukleotidů přítomna ještě dvoumocná měď,

přítomnost má vody naopak stabilizující efekt pro vzniklý komplex Cu^{2+} -Res-DNA (Mikulski a Molski 2010). V experimentální části této práce je tomuto rozporu věnována pozornost.

Z *in vivo* i *in vitro* experimentů (Fukuhara a Miyata 1998; Fukuhara *et al.* 2006) a výpočetních studií (Mikulski *et al.* 2014) je známo, že **Res** tvoří adukty, nebo spíše komplexy s mědí (konkrétně s měďnatým kationtem), které se pak následně buď interkalují do DNA nebo interagují s methylovanou DNA. Kromě interkalace se zde uplatňují i reakce na hydroxylových skupinách. K tomu, abychom pochopili význam tvorby komplexů **Res** s Cu^{2+} , je nutné znát strukturu těchto komplexů, k čemuž opět dobře poslouží výpočty kvantové chemie a experimenty v plynné fázi (viz experimentální část). Interakce s Cu^{2+} je třeba též studovat z toho důvodu, že, jak se zdá (Belguendouz *et al.* 1997), tak **Res** právě ve formě komplexu s Cu^{2+} interaguje s buněčnou membránou.

1.9.1.4 Kritický pohled na účinky resveratrolu na lidské zdraví

Od doby, kdy byl **Res** pro svět objeven (1940), popsán jako fytoalexin (1976), nalezen ve víně (1992) a byla mu připsána účinnost v prevenci proti rakovině (1997), se stále zvyšuje počet publikací a citací článků o **Res** (Baur a Sinclair 2006). V databázi Web of Science (Core Collection) je ke dni odevzdání práce evidováno celkem 14 329 příspěvků o resveratrolu, z toho 1 046 shrnujících článků (review). Nejprve byly publikovány především studie demonstrující jeho významné pozitivní účinky, na druhou stranu se v posledních deseti letech množí práce, které **Res** naopak připisují i negativní účinky na lidský organismus. Tato pasáž se pokouší nejvýznamnější práce o ambivalentních účincích **Res** shrnout.

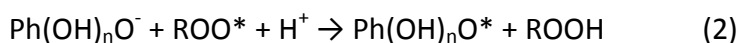
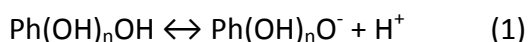
Res a jeho dimer v přítomnosti iontů přechodných kovů (zejména Cu^{2+}) indukuje oxidativní poškození DNA (Fukuhara a Miyata 1998). **Res** je efektivní inhibitor peroxidativní inhibice LDL (low density lipoprotein) např. v membráně cév (Frankel *et al.* 1993), přičemž mechanismus působení je právě přes komplex **Res** s Cu^{2+} (Belguendouz *et al.* 1997). **Res** má schopnost indukovat štěpení DNA, což bylo potvrzeno na superzavinuté (supercoiled) DNA pomocí fluorescenční emisní spektroskopie. Předpokládaný mechanismus působení **Res** na duplex DNA je, že **Res** tvoří komplex s Cu^{2+} (v poměru 1:1), kdy se Cu^{2+} váže na **Res** přes OH skupinu lokalizovanou na 4'C (Fukuhara *et al.* 2006). I další studie (prováděné např. na lymfocytech) potvrzují, že vlivem komplexu Cu^{2+} /**Res** dochází k degradaci DNA (Azmi *et al.* 2005).

Z těchto důvodů jsou v případové studii této práce studovány jak reakce samotného **Res**, tak **Res** s Cu^{2+} a také **Res** s tebukonazolem (viz dále) a také **Res** s tebukonazolem a Cu^{2+} .

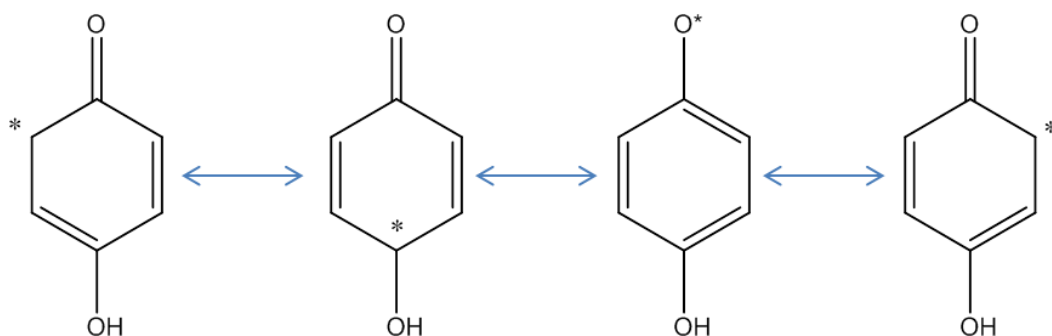
1.9.1.5 Vznik anti-oxidačních a pro-oxidační forem resveratrolu

Existují tedy dvě skupiny článků (potažmo vědců), kteří připisují **Res** anti-oxidační účinky, nebo naopak tvrdí, že jeho chování závisí na podmínkách prostředí a může se **Res** chovat i jako pro-oxidant. Z hlediska fyzikálně-chemických experimentů pomocí instrumentálních metod je důležité konkrétně identifikovat formy **Res**, které působí jako anti-oxidant a které jako pro-oxidant.

Res patří mezi polyhydroxylové (fenolické) $\text{Ph}(\text{OH})_n\text{OH}$ antioxidanty umožňující vznik reaktivních forem, které se budou chovat anti-oxidačně, tj. budou schopny z prostředí přijmout velmi reaktivní (pro organismus nebezpečný) radikál (ROO^*). Obecně je mechanismus vzniku a působení $\text{Ph}(\text{OH})_n\text{OH}$ jako anti-oxidantu popsán následovně (Burkitt a Duncan 2000):

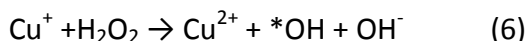
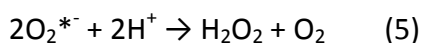
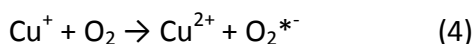
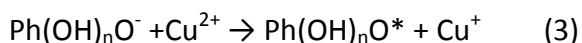


Díky rezonanční stabilizaci (**obr. 20**) je vzniklý $\text{Ph}(\text{OH})_n\text{O}^*$ méně reaktivní než ostatní radikály (ROO^*). Funguje tedy jako jakýsi „zhášec“ samo-propagačního řetězce radikálových reakcí. Tedy v získaných výsledcích fyzikálně-chemických experimentů (konkrétně z hmotnostních spekter) bude důležité identifikovat právě (i) deprotonované formy **Res**, které potenciálně mají anti-oxidační účinky (schopnost přijmout volný elektron od radikálu a tím jej „zhasit“) a (ii) **Res** ve formě radikálů, který již představuje výsledný produkt radikálového přenosu (tedy formu **Res** po proběhlém „zhášení“ radikálu), ale též představuje zpětně potenciální pro-oxidant pro okolí.



Obr. 20. Schématické znázornění delokalizace radikálu v p-hydroxyfenoxylovém systému (upraveno dle Jahnert *et al.* (2014))

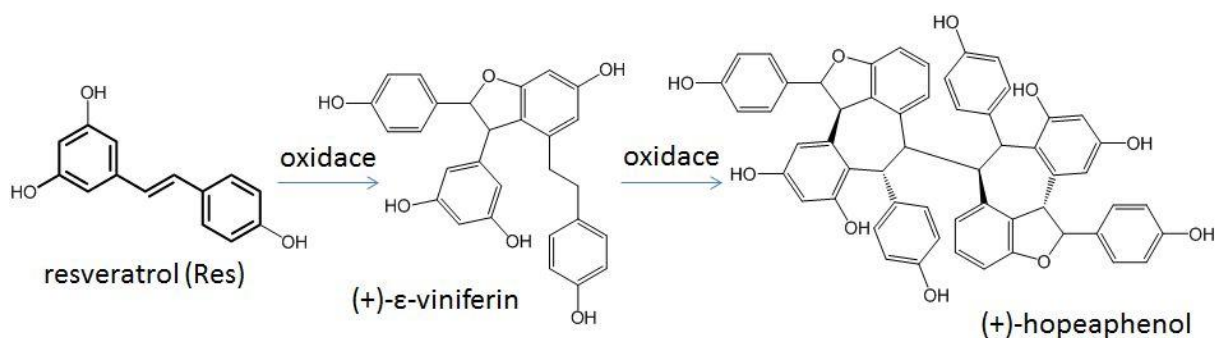
Pro-oxidační chování polyfenolických látek souvisí s jejich snadnou oxidovatelností např. v přítomnosti iontů kovů (Fukuhara a Miyata 1998; Yamanaka *et al.* 1997), kdy dochází k redukci kyslíku na velmi reaktivní hydroxyradikál (*OH). Mechanismus (tzv. Fentonova reakce) popisující pro-oxidační chování polyhydroxylových látek v přítomnosti Fe^{3+} a Cu^{2+} je následující (Burkitt a Duncan 2000):



V experimentech snažících se simulovat vznik pro-oxidačních forem **Res** bude tedy zajímavé sledovat (i) radikály **Res**, (ii) radikály přidaných látek, které mohly vzniknout právě v důsledku pro-oxidačního působení **Res**, ale také budou zajímavé (iii) adukty s kationty mědi, které mohou osvětlit, ve které fázi se oxidačně/redukční sled reakcí nachází.

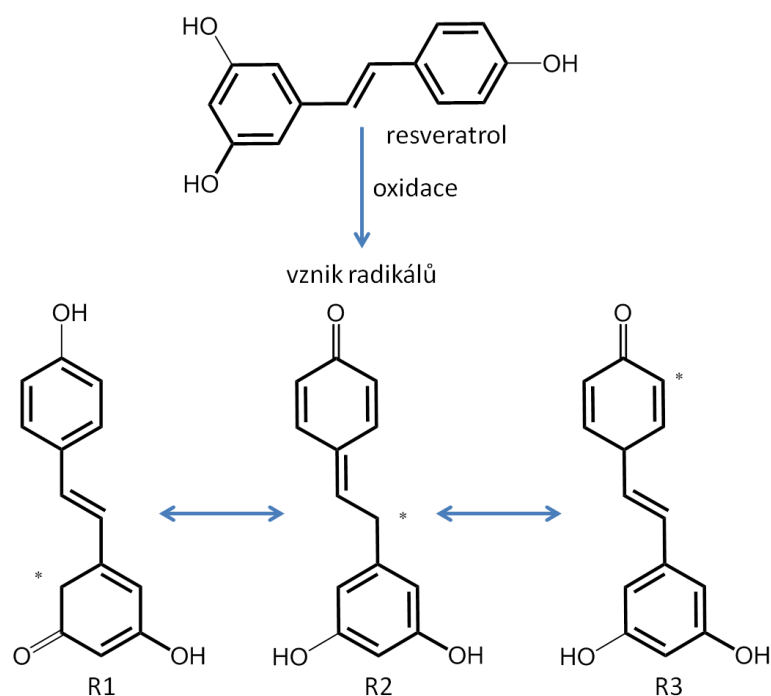
1.9.1.6 Biotransformace resveratrolu

Z některých rostlin (nejčastěji z čeledi *Vitaceae*, *Diprercarpacae*, *Leguminosae*, *Cyperaceae* a *Gnetaceae*) bylo izolováno několik oligostilbenů, které svou biotransformaci odvozují právě od **Res** (**obr. 21**). Příkladem může být (+)- ϵ -viniferin, který je dimerem **Res** s přesnou molekulovou hmotou (exact mass) $454,14 \text{ g mol}^{-1}$, dále potom tetramer **Res** (+)-hopeafenol s přesnou hmotou $874,28 \text{ g mol}^{-1}$, oba vznikají oxidací **Res**.

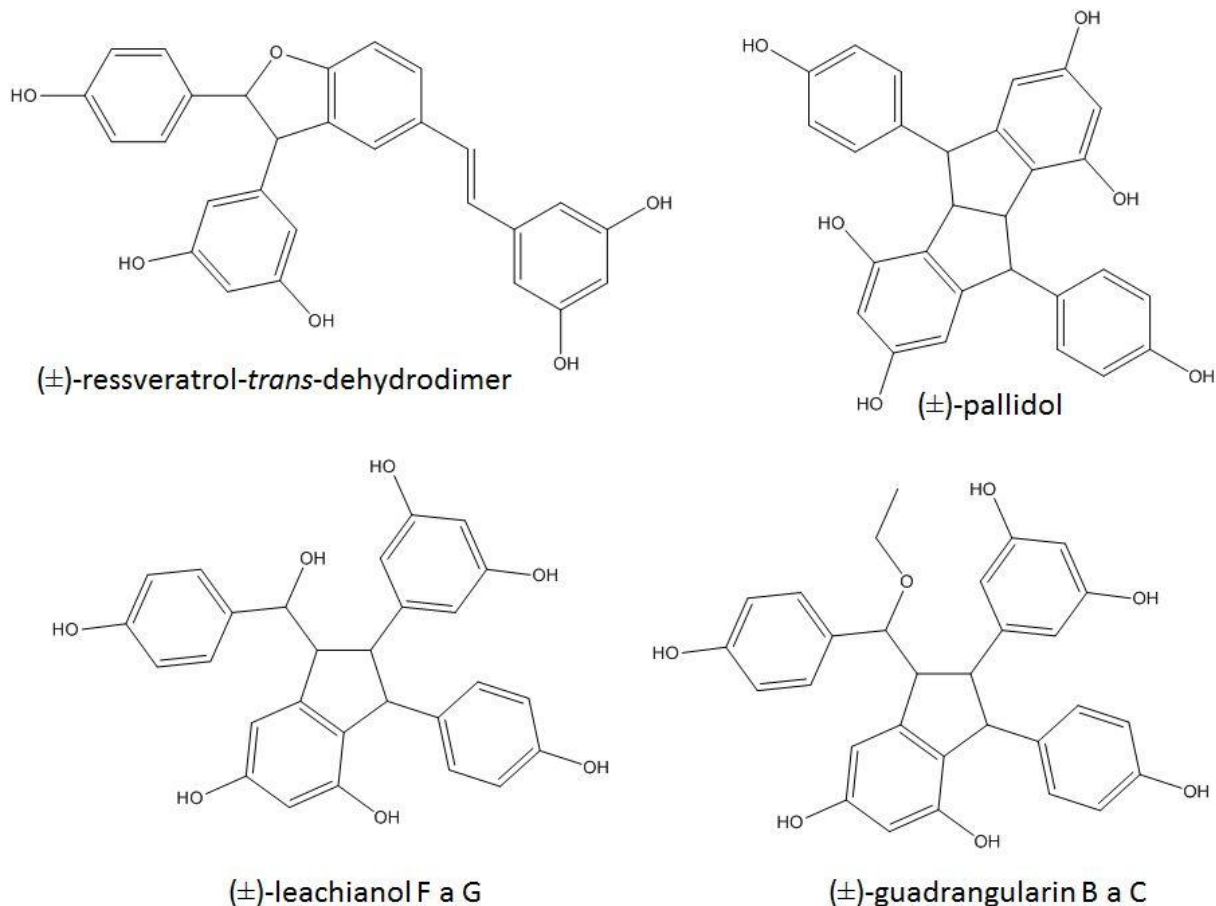


Obr. 21. Předpokládaná biogeneze některých oligostilbenů (úprava dle Takaya *et al.* (2005))

K tomu, aby vznikaly dimery (i vyšší oligomery) **Res**, je nejprve nutné **Res** oxidovat a vytvořit jeho možné radikály. Podle Takaya *et al.* (Takaya *et al.* 2005) jsou tyto radikály tři (**obr. 22**). Z těchto radikálů (R1, R2 a R3) potom v přírodě vznikají ε-viniferin (R1 + R2), pallidol (R2 + R2) a resveratrol-trans-dehydrodimer (R2 + R3). Tyto produkty i další (**obr. 23**) se dají očekávat jako produkty reakcí, kde **Res** vystupuje jako anti-oxidant, tedy se sám oxiduje. Právě nalezení těchto produktů oxidace je jedním z cílů případové studie.



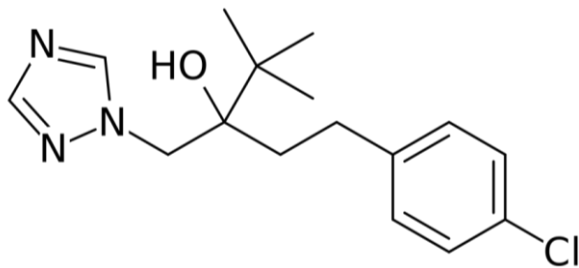
Obr. 22. Vznik radikálů resveratrolu (R1, R2 a R3) působením oxidantů (podle Takaya *et al.* (2005)).



Obr. 23. Produkty oxidace resveratrolu působením oxidačních činidel a peroxidáz (podle Takaya *et al.* (2005)).

1.9.2 Tebukonazol

Tebukonazol (**Teb**), systematickým názvem (*RS*)- 1-(4-chlorofenyl)- 4,4-dimethyl-3-(1*H*, 1,2,4-triazol-1-ylmethyl)pentan-3-ol (**obr. 24**), patří z chemického hlediska mezi (tri)azoly. V zemědělství je využíván k ochraně rostlin (jejich plodů) před houbovými onemocněními, v České republice (ale i jinde ve světě) se využívá zejména ve vinařství jako náhrada dříve používaného síranu měďnatého (skalice modrá). Aplikuje se jako postřik na plody, tak i na listy; jeho přítomnost lze zjistit jak v plodech révy vinné (Authority 2015; Mohapatra *et al.* 2010), tak i v půdním roztoku (Jaklová Dyrtrtová *et al.* 2014; Jaklová Dyrtrtová *et al.* 2011a). Pro potřeby této práce je uváděn zejména proto, že je často přítomen ve víně současně s **Res**, dá se tedy předpokládat jejich vzájemná interakce, případně koktejlové interakce s dalšími přítomnými látkami.



Obr. 24. Strukturní vzorec tebukonazolu ((*RS*)- 1-(4-chlorofenyl)-4,4-dimethyl-3-(1*H*, 1,2,4-triazol-1-ylmethyl)pentan- 3-ol), **Teb**

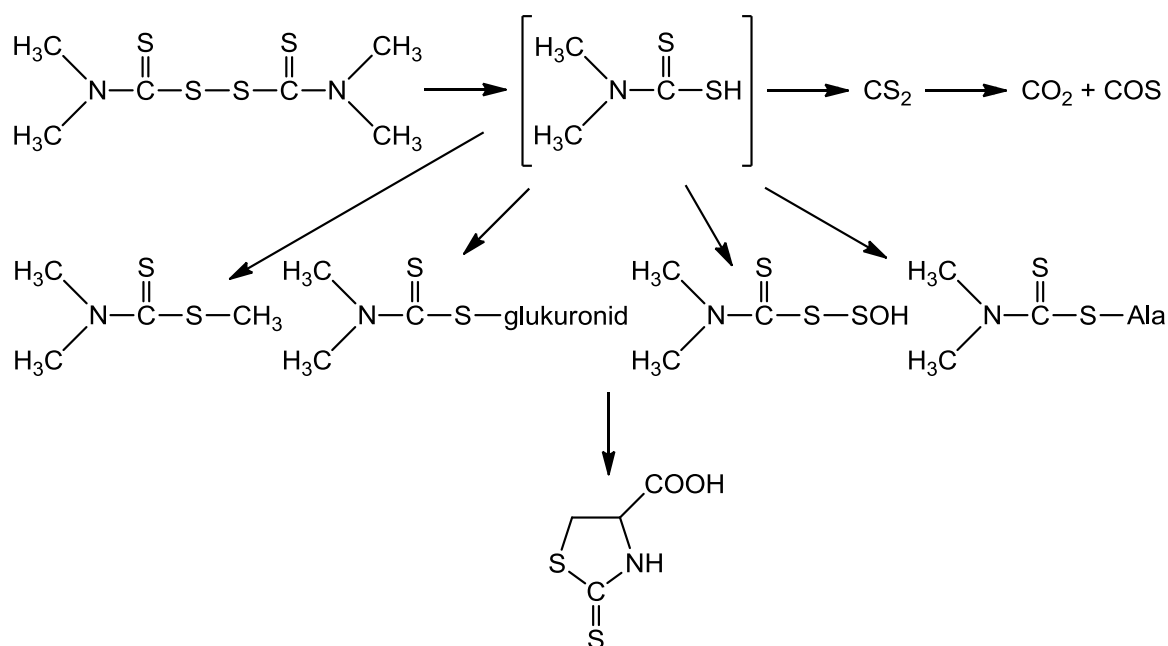
U **Teb** byly zjištěny redukční účinky a také interakce s měďnatými kationty (Jaklová Dyrtrtová *et al.* 2011a). U samotného **Res** se také předpokládají redukční účinky (anti-oxidační). Otázkou zůstává, jak spolu (pokud vůbec) budou zmíněné látky interagovat. Na tuto otázku se pokouším dát odpověď v případové studii.

Jak již bylo naznačeno v úvodu, ve víně je vždy v nějaké formě přítomna měď. Viniční půda je typická vysokými obsahy mědi, zejména v důsledku v minulosti dlouhodobé aplikace síranu měďnatého jako fungicidu (v současnosti se v Evropě omezuje) (Kovacic *et al.* 2013). **Teb** se začal využívat právě místo síranu měďnatého k ochraně vinné révy proti houbovým onemocněním. Bylo zjištěno, že **Teb** velmi ochotně tvoří komplex především s mědí (Jaklová Dyrtrtová *et al.* 2011a; Jaklová Dyrtrtová *et al.* 2013), ale i se zinkem (Jaklová Dyrtrtová *et al.* 2014), nebo i stříbrem (Jaklová Dyrtrtová *et al.* 2013). Proto je v případové studii zařazeno studium systému Cu^{2+} – **Teb** – **Res**, tedy dalo by se říci „koktejlový efekt“ **Res** ve víně.

1.9.3 Thiram

Z hlediska aplikovatelnosti představované instrumentální techniky (EC-ESI-MS viz) je zde zařazeno mimikování první metabolické cesty Thiramu (**T**, **obr. 25**), tj. redukce disulfidové vazby. **T** je jedním s často používaných fungicidů, a to nejen v zemědělství, ale též se využívá i v humánní medicíně např. k léčbě svrabu. Z chemického hlediska se jedná o symetrickou molekulu, v jejímž středu se nachází disulfidová vazba. Právě díky přítomnosti této vazby byl **T** vybrán pro testování. První metabolická přeměna **T** spočívá v eliminaci disulfidové vazby a vzniku dvou totožných produktů, které jsou následně dále detoxifikovány adicí methylové skupiny, glukuronidu, hydroxylové skupiny nebo alaninu (**obr. 25**). Výsledným produktem

metabolických přeměn **T** je thiazolidin-2-thion-4-karboxylová kyselina. První krok metabolické přeměny **T** (eliminace/redukce disulfidové vazby) lze mimikovat pomocí EC-ESI-MS (Jaklová Dyrťová a Jakl 2016b). Redukce disulfidové vazby pomocí EC-ESI-MS je zajímavá také proto, že se nachází ve většině proteinů a často je součástí jejich reakčního centra. Lze předpokládat, že experimentální eliminaci disulfidové vazby pomocí EC-ESI-MS u **T** bude možné využít i na některé proteiny (u nichž je disulfidová vazba na povrchu proteinu).



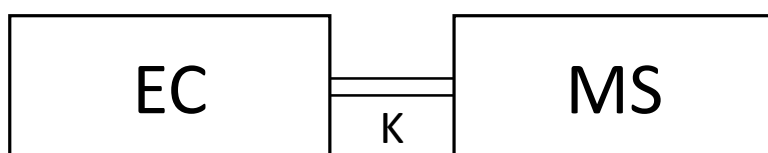
Obr. 25. Schéma metabolismu thiramu (upraveno dle Dalvi *et al.* (2003) a Roberts a Hutson (1999)).

K eliminaci disulfidové vazby **T** pomocí EC-ESI-MS dochází na měděné elektrodě (Jaklová Dyrťová a Jakl 2016b), přičemž měděnou elektrodu lze využít ke stanovení **T** v biologických matricích pomocí elektrochemických metod (Nováková *et al.* 2013).

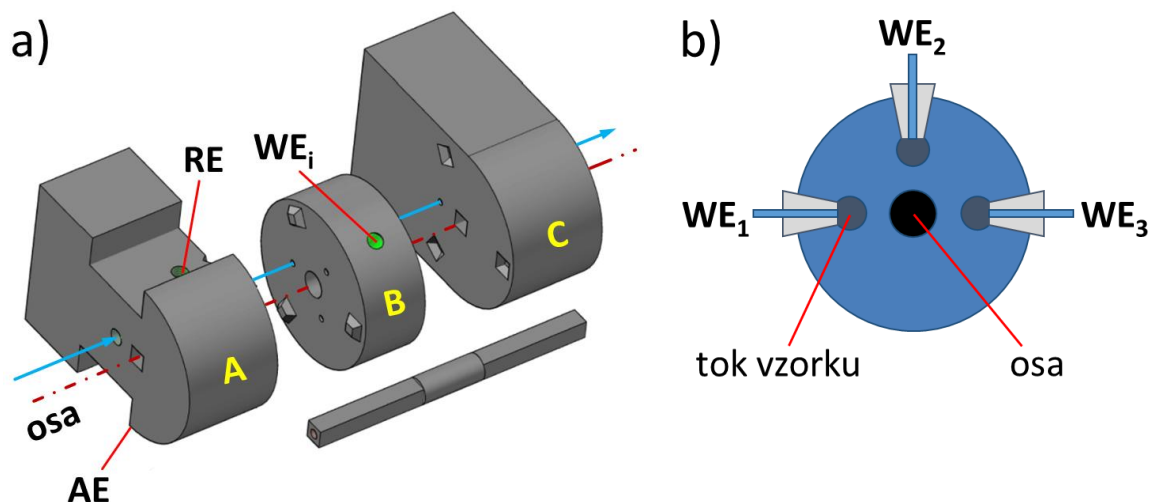
2 Zjednodušený popis experimentálního systému použitého v případové studii

2.1 Popis elektrochemické cely

Elektrochemická cela (EC) je schopna pracovat v průtočném režimu v dvouelektrodevém i tříelektrodevém zapojení potenciostatu a je kompatibilní pro *on-line* zapojení s hmotnostním spektrometrem s ionizací elektrosprejem (obr. 26). EC cela sestává ze segmentů obsahujících pracovní elektrody (WE_i), pomocnou elektrodu (AE) a referentní elektrodu (RE), přívodní, zabudované a odvodní kapiláry (obr. 27). Přívodní kapilára ústí do prvního segmentu, kde jsou umístěny proti sobě AE (Pt drátek) a RE. RE je od analyzovaného roztoku oddělena fritou a je tvořena pochloridovaným Ag drátkem (Ag/AgCl) ponořeným do 1 mol L^{-1} roztoku NH_4Cl . Střední segment je otočný okolo středního hřídele (osy) a obsahuje tři pracovní elektrody (Ag, Au, Cu drátky). WE_i jsou ve středním segmentu umístěny pomocí závitů po obvodu. Střední segment dále obsahuje tři zabudované kapiláry, které se s přívodní a následně odvodní kapilárou propojí patřičným pootočením středního segmentu podél středního hřídele. Těsné spojení středního segmentu se segmentem přívodním a odvodním je provedeno pomocí kroužkového těsnění. Odvodní segment zajišťuje odvod vzorku a napojení na odvodní kapiláru, kterou je vzorek přiváděn přímo na sprejovací kapiláru hmotnostního spektrometru (obr. 26). Zařízení je připojeno k potenciostatu a je vhodné jej umístit do Faradayovy klece. Vzorek je dávkován ze stříkačky, jejíž posun, a tedy tok vzorku, je zajištěn mechanickým posuvníkem napojeným přes stříkačku na přívodní kapiláru (obr. 28). Hlavní část zařízení tvoří vlastní EC, jež je napojena kapilárou (K) na MS (obr. 26).



Obr. 26. Schematický náčrt spojení elektrochemické cely (EC) s hmotnostním spektrometrem (MS) (zdroj: autorka).



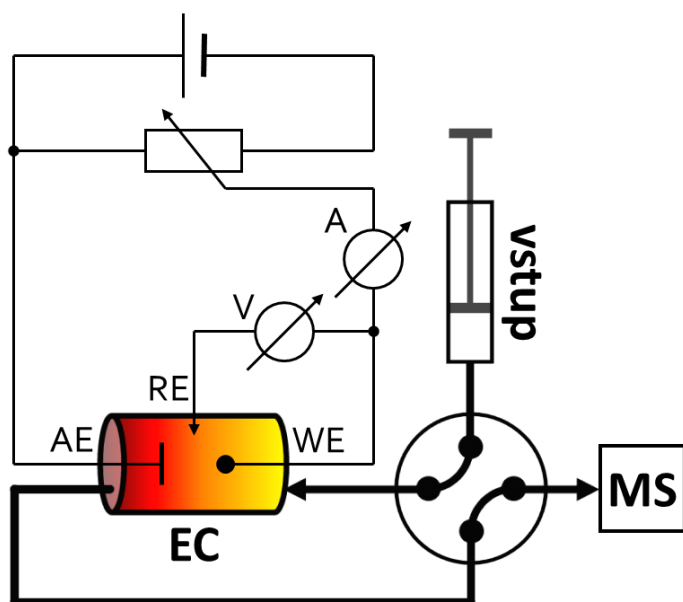
Obr. 27. Schematický náčrt spojení elektrochemické cely obsahující více než jednu pracovní elektrodu (WE_i), elektrodu referentní (RE) a elektrodu pomocnou (AE).

Elektrochemická cely (EC) byla provedena v několika možných sestavách, které jsou podrobně popsány v příloženém patentu. Celé zařízení bylo umístěno ve Faradayově kleci. Vkládané elektrochemické signály a registrované signály byly generovány a vyhodnocovány pomocí počítačem řízeného elektrochemického zařízení Multielchem (Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, v.v.i., ČR).

Volba elektrod, vkládání elektrochemického signálu (např. napětí, proudu) na elektrody a odečítání generovaného signálu z EC může být zajištěno buď analogovým, nebo digitálním přístrojem řízeným počítačem s odpovídajícím softwarem nebo zajišťováno přímo lidskou obsluhou.

Pro konstrukci vlastního těla elektrochemické cely byly voleny materiály s vysokou odolností/inertností vůči široké škále rozpouštědel (polárních i nepolárních), aby tak byla zaručena možnost použití tohoto zařízení pro co nejširší škálu vzorků a aplikací. Dalším kritériem byla vysoká mechanická odolnost použitých materiálů a možnost vytvoření dobře těsnících spojení a možnost vrtání a obrábění použitého materiálu. Jako základní konstrukční materiály byly použity Teflon[®], polypropylen a polyetherketon (PEEKTM) pro výrobu těla elektrochemické cely a uchycení WE_i , AE a RE. Pro výrobu inertních těsnění byl použit materiál NBR 70 (Simrit[®]). Na výrobu RE byly použity frity vysoké hustoty z Kevralu[®] anebo keramiky. Kovy na výrobu elektrod byly voleny tak, aby pokryly nejširší možnou škálu generovaných iontů vzácných kovů běžných pro výrobu elektrod pro tvorbu stabilních

nabitých aduktů s organickými látkami. Vhodné jsou zejména jednodruhové elektrody z kovů s vysokou čistotou (Pt, Au, Ag, Cu). Pro přivedení vzorku k EC a následně k přívodu vzorku do MS byly voleny kapiláry, které splňují vysoké nároky jak na inertnost vůči nejširší škále rozpouštědel, tak i na pružnost, zajišťující jejich stabilitu při běžné manipulaci. Jako vhodné kapiláry je možné použít např. kapiláry s výstelkou z PEEKu anebo jim podobné.



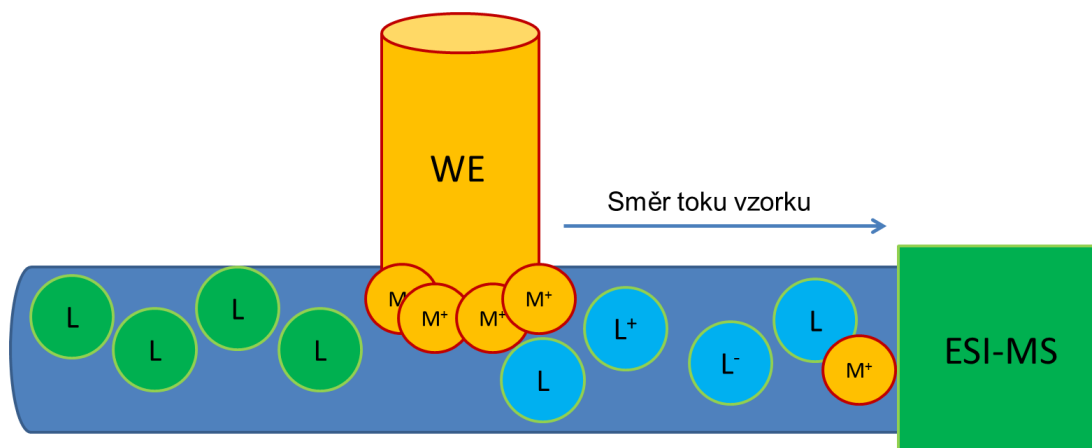
Obr. 28. Schématické znázornění sestavy *on-line* zapojené elektrochemické cely (EC) v tříelektrodovém zapojení potenciostatu před hmotnostní spektrometr (MS) včetně dávkování vzorku, (zdroj: autorka).

2.2 Princip elektrochemické přeměny studovaných látek

EC je možné využít několika způsoby (Jaklová Dyrťová a Jakl 2016a; Jaklová Dyrťová *et al.* 2015; Jaklová Dyrťová *et al.* 2016a): (i) pro vyvázání analytu z matrice, (ii) pro elektrochemickou aktivaci nepolárního analytu a (iii) pro elektrochemickou přeměnu analytu a studium mechanismu reakce (biomimetiku). V případové studii této práce byla využita třetí možnost, ostatní aplikace a s tím spojené principy jsou podrobně popsány v příložených člancích.

Schematicky je princip elektrochemické přeměny analytu (**L**) ukázán na **obr. 28**. Vzorek obsahující **L** proudí do elektrochemické cely, kterou na obrázku symbolizuje pracovní

elektroda (WE). Na WE je vkládán reakční potenciál, který umožní přeměnu **L** (oxidaci (L^+), redukci (L^-), strukturní nebo konformační změnu (na obr. naznačenou změnou barvy **L**), případně uvolnění atomů z těla WE a vytvoření aduktu (iontu) s atomem uvolněným z těla WE (M^+L).



Obr. 29 Princip elektrochemické přeměny analytu (**L**); WE – pracovní elektroda, ESI-MS – hmotnostní spektrometr s ionizací elektrosprejem, další podrobný popis v textu (zdroj: autorka).

2.3 Použité chemikálie v případové studii

Tato kapitola je velmi zestručněna; přesné postupy lze najít v příložených publikacích.

Pro přípravu vzorků byla použita různá organická rozpouštědla většinou ve směsi s deionizovanou vodou (18 M Ω). Z organických rozpouštědel byl především využíván ethanol (Ing. Petr Švec – Penta, ČR), výjimečně methanol (Maneko, ČR). Konkrétní složení rozpouštědla je vždy uvedeno u konkrétního příkladu měření, většinou se však jednalo o směs s vodou 1:1.

Pro elektrochemická měření byl využíván základní elektrolyt, nejčastěji se jednalo o 25mmol L⁻¹ octan amonný připravený ze soli octanu amonného (Ing. Petr Švec – Penta, ČR) rozpuštěného v deionizované vodě na koncentraci 1 mol L⁻¹, případně o 25 mmol L⁻¹ octan sodný připravený ze soli octanu sodného (Ing. Petr Švec – Penta, ČR) rozpuštěného v deionizované vodě na koncentraci 1 mol L⁻¹. Pro plnění RE byl použit 1 mol L⁻¹ chlorid amonný rozpuštěným soli chloridu amonného (Ing. Petr Švec – Penta, ČR) v deionizované

vodě. Stříbrný drátek (průměr 1 mm; Goodfellow Corp., USA) pro přípravu RE byl pochloridován v 1 mol L⁻¹ roztoku chloridu draselného připraveného z pevného chloridu draselného (Sigma-Aldrich, ČR) rozpuštěného v demineralizované vodě. Všechny základní elektrolyty byly skladovány při teplotě 4°C po dobu maximálně 6 měsíců, poté byly připraveny nové zásobní roztoky.

Vzorky byly připravovány z certifikovaných standardů (Sigma-Aldrich, ČR) studovaných látek, které byly skladovány dle instrukcí dodavatele. Ze standardů dodaných ve formě solí vysoké čistoty byly připraveny standardní roztoky do ethanolu případně methanolu a skladovány buď při teplotě 4°C (tebukonazol, thiram) nebo (-18°C) resveratrol ne déle než jeden měsíc. Vzorky byly míchány na požadovanou koncentraci (nejčastěji 5*10⁻⁵ mol L⁻¹) z těchto standardních roztoků.

2.4 Postup měření

Postupy měření jsou zde uváděny ve zjednodušené podobě a mají sloužit k základní orientaci v případové studii práce, podrobnější postupy se nacházejí v příložených publikacích.

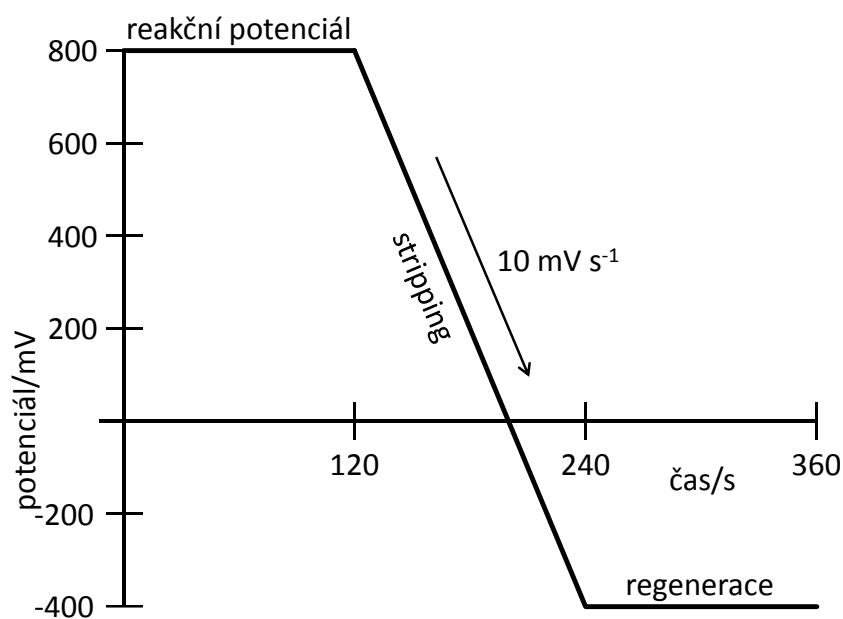
2.4.1 Postup měření pomocí ESI-MS

Pro většinu experimentů byl využit hmotnostní spektrometr s iontovou pastí a ionizací vzorku elektrosprejem, který operuje v kladném (studium kationtů) i záporném modu (studium aniontů), Finnigan LCQ Advantage (ThermoFinnigan, USA). Tento hmotnostní spektrometr umožňuje studovat i vícenásobně nabitě ionty v rozsahu m/z (poměr hmotnost/náboj) 50 až 2000.

Standard studované látky byl naředěn na vhodnou koncentraci (nejčastěji 5*10⁻⁵ mol L⁻¹), do Hamiltonovy dávkovací injekční stříkačky a pod kontinuálním průtokem (obvykle 0,6 ml/hod) dávkován do elektrospreje. Podmínky elektrospreje byly optimalizovány pro získání ideální poměr intenzita/rozlišení, nahrávaná spektra byla následně vyhodnocena v programu Thermo Xcalibur 2.2 a zpracována v programu OriginPro 8.5 (OriginLab Corporation).

2.4.2 Postup měření pomocí EC-ESI-MS

Před zapojením EC před MS byl celý systém nejprve promyt rozpouštědlem průtokem 1 ml/hod (po dobu 10 min), pak byla EC spojena s hmotnostním spektrometrem. Potom byl systém opět rozpojen, průtok byl snížen na 0,5 ml/hod a dávkován byl čistý základní elektrolyt (po dobu 10 min) a byla provedena správnost zapojení elektrod a těsnění. Cella byla opět připojena k hmotnostnímu spektrometru a při zachovaném průtoku byl dávkován vzorek. Na celu nebyl vkládán žádný potenciál, dokud nebyly nahrány 3 záznamy hmotnostního spektra. Potom byl na WE vložen příslušný potenciál, který zaručoval elektrochemickou konverzi substrátu na elektrodě. Na WE byl vkládán konstantní potenciál po dobu 2 min (reakční potenciál), potom další 2 min byl potenciál kontinuálně měněn až do záporných hodnot (stripping), kde byl následně také po dobu 2 minut držen (regenerace) (obr. 30).

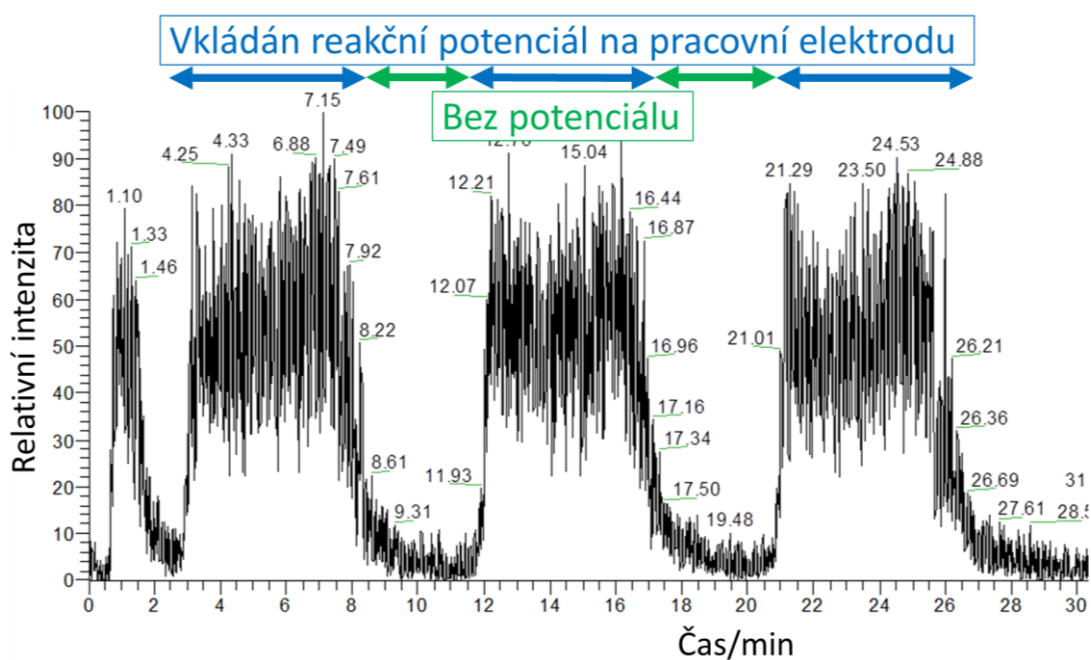


Obr. 30. Schématicky znázorněný průběh procesů závisících od vkládaného potenciálu v konkrétních časech na pracovní elektrodě (zdroj: autorka).

Během elektrochemického cyklu znázorněného na obr. 30 byl zároveň snímán signál z MS a nahráváno hmotnostní spektrum, které pak sloužilo k vlastnímu vyhodnocení dat. Získaný voltamogram z elektrochemického cyklu (fáze stripping) sloužil jako ověření, že

k elektrochemické konverzi skutečně došlo a nedošlo během elektrochemického cyklu ke např. zkratu. Každý elektrochemický cyklus byl opakován minimálně 3x.

Na **obr. 31** je ukázán záznam intenzity jednoho z produktů elektrochemické přeměny v závislosti na vkládaném reakčním (generačním) potenciálu. V případě, že byl až několik minut vkládán na WE reakční potenciál (na obrázku úseky znázorněné modrými šipkami), bylo možné v MS detekovat produkt této elektrochemické přeměny, který se projeví zvýšením intenzity signálu příslušné m/z . Pokud reakční potenciál vkládán nebyl (bez potenciálu, úseky označeny zelenými šipkami) intenzita signálu m/z náležejícího produktu elektrochemické proměny klesla téměř na nulu. Z **obr. 31** je též patrné, že systém elektrochemické přeměny analytu v produkt měl velmi dobrou opakovatelnost, a to i po několika minutovém (6 min) generování ve třech opakováních bez jakékoli regenerace pracovní elektrody.



Obr. 31. Záznam relativní intenzity signálu m/z příslušející produktu elektrochemické přeměny v čase, kdy byl po určité úseky vkládán reakční potenciál (označeno modrými šipkami) nebo byl systém držen bez potenciálu (označeno zelenými šipkami) (zdroj: autorka).

3 Případová studie

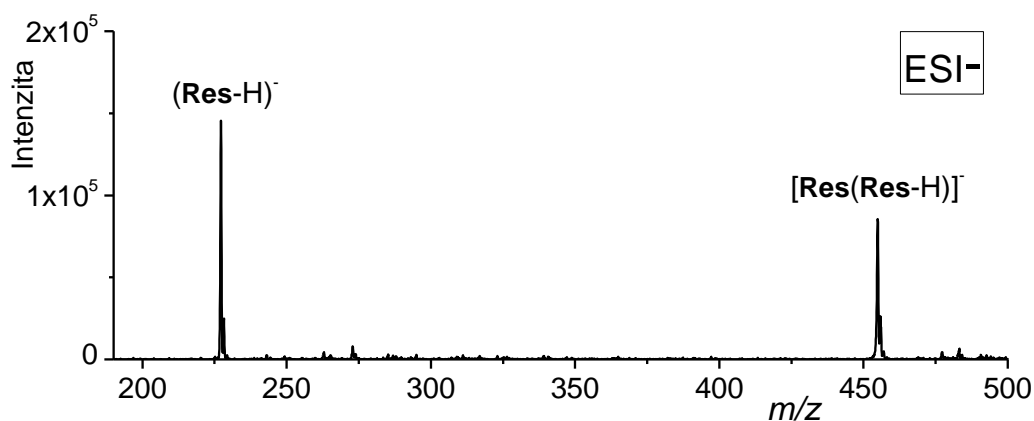
Tato případová studie má ukázat, jak s využitím samotné hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem (ESI-MS) samotné nebo ve spojení s navrženou elektrochemickou celou (EC/ESI-MS) je možné získat podrobné údaje o interakcích a reaktivitě látek. Studovaný systém je v prvním kroku velmi jednoduchý a obsahuje pouze **Res** (nebo **Teb**, nebo **T**), poskytuje tedy informace o chování jednotlivých látek, pokud jsou v systému přítomny samotné. Postupně je studovaný systém komplexnější, obsahuje více složek (více látek); z těchto experimentálních dat je možné usuzovat na vzájemné interakce. Většina uvedených informací, obrázků a grafů je součástí publikací autorky, které jsou součástí přílohy. Zbylé prezentované informace jsou součástí připravovaných manuskriptů.

3.1 Chování samotného resveratrolu v podmínkách ESI-MS

Res je jedním z potenciálních antioxidantů, o jehož účinnosti/neúčinnosti existuje celá řada publikací, viz rešeršní část. Přítomnost reaktivních hydroxylových skupin činí **Res** velmi zajímavou molekulou, která bude různě reagovat za různých podmínek. Tato část se věnuje popisu vzniku forem **Res**, které vznikají v procesu nebulizace během elektrospreje, a to jak v kladném, tak i záporném modu.

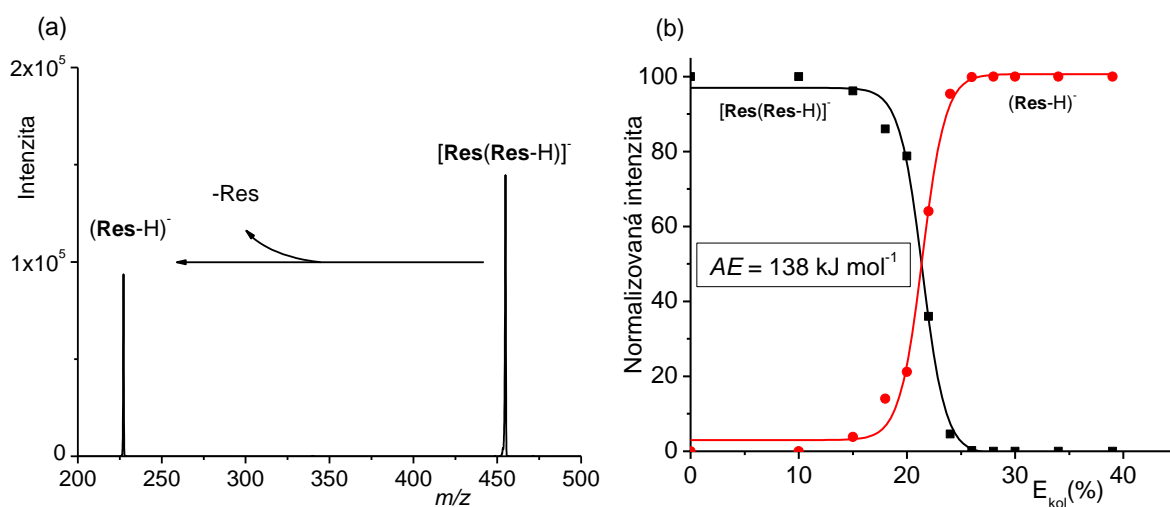
Res obsahuje celkem tři OH substituenty, tedy tři potenciální místa reaktivity. Redukce **Res** byla prováděna pomocí ESI-MS v záporném modu; roztok (ethanol/voda 1:1) obsahující $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ **Res** byl ionizován a převáděn do plynné fáze.

V negativním modu (**obr. 32**) byl pozorován vznik deprotonovaného **Res** (**Res-H**)⁻ a dimeru neutrálního **Res** s deprotonovaným **Res** [**Res(Res-H)**]⁻. Právě tyto dvě formy **Res** nesoucí záporný náboj jsou schopny se vázat na volné radikály; tedy působit antioxidantně (redukčně), tj. budou se samy oxidovat.



Obr. 32. Hmotnostní spektrum v negativním modu, resveratrol (**Res**) $2,5 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹ ve směsi ethanol/voda 1:1 (zdroj: autorka).

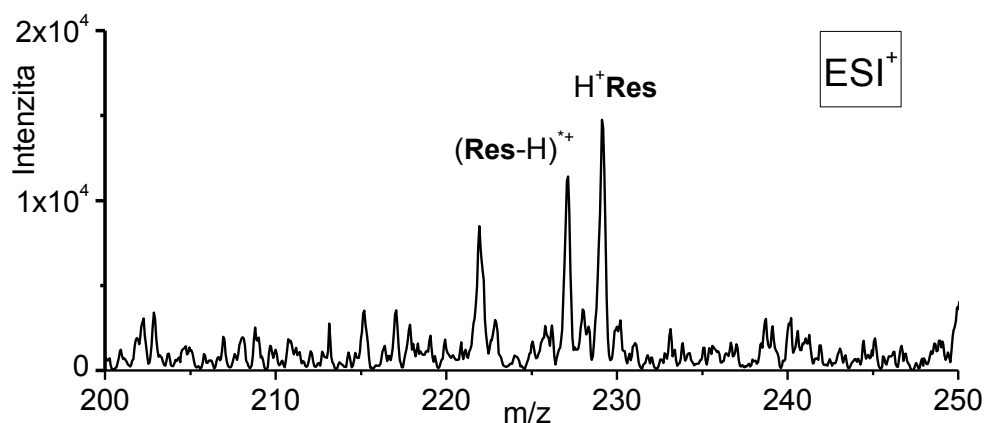
Identita dimeru [**Res(Res-H)**]⁻ byla ověřena pomocí kolizních experimentů (**obr. 33a**) a též byla změřena energie potřebná k rozbití vazby mezi **Res** a **Res-H**⁻ (**obr. 33b**), která je 138 kJ mol⁻¹.



Obr. 33. (a) Fragmentační CID ms/ms spektrum, (b) závislost intenzity [**Res(Res-H)**]⁻ a (**Res-H**)⁻ na kolizní energii (zdroj: autorka).

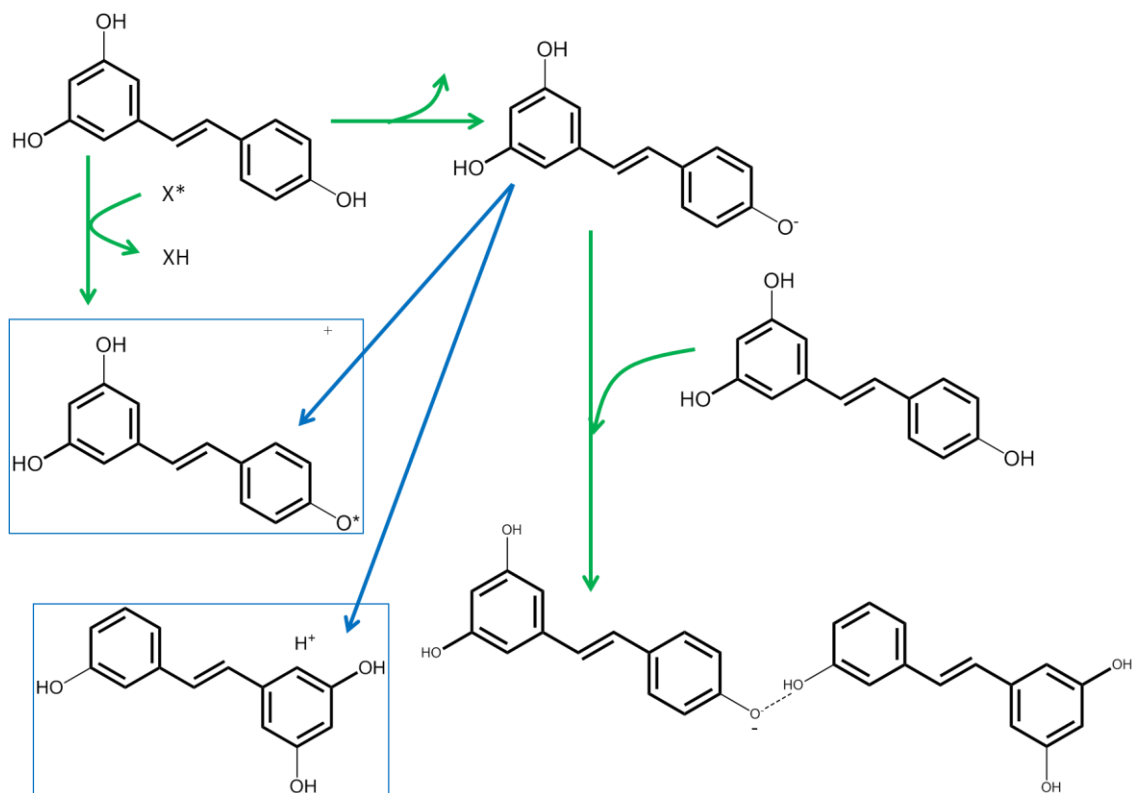
Pokud je v prostředí přítomen samotný **Res**, tak se jeho formy působící pro-oxidačně téměř nevytváří, chová se tedy jako anti-oxidant. Vznik pro-oxidačních forem **Res** je patrný pouze v omezeném množství (na úrovni šumu), a to v pozitivním modu (**obr. 34**), které byly indukovány vloženým kladným potenciálem (4,5 kV) v pozitivním modu, tedy v silně pro-

oxidačním prostředí. Takto tedy vypadají formy **Res** ve chvíli, kdy zabrání oxidaci jiného substrátu nebo přijmou potenciálně škodlivý radikál. Vzniká (i) protonovaný **Res** (H^+Res), kdy neutrální molekula **Res** přijímá z prostředí vodíkový kation, a (ii) objeví se též radikál kation ($\text{Res-H})^{*\dagger}$.



Obr. 34. Hmotnostní spektrum v pozitivním modu, resveratrol (**Res**) $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ve směsi ethanol/voda 1:1.

Obr. 35 shrnuje možné formy **Res** a genealogii jejich vzniku, které se tvoří během nebulizace v záporném i kladném ionizačním modu. Tyto formy se rovněž vyskytují v biologických systémech, jak bylo uvedeno v **kapitole 1.9**.



Obr. 35. Schéma vzniku různých forem **Res** v negativním modu (*zeleně*) a pozitivním modu (*modře*) (zdroj: autorka).

3.2 Interakce resveratrolu s Cu^{2+}

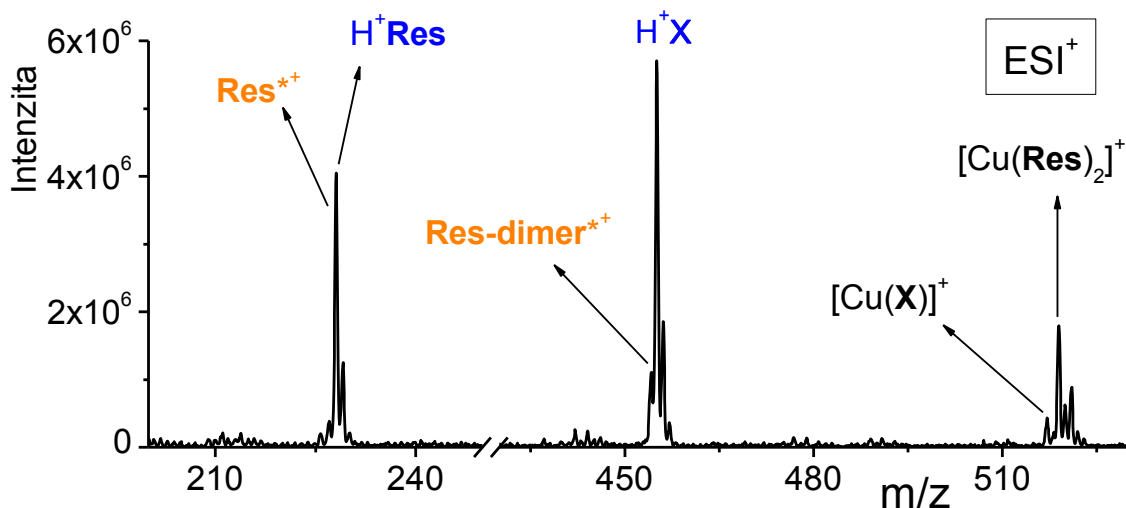
Interakce mědi jsou velmi zajímavé už z toho důvodu, že měď je součástí aktivních center některých významných enzymů komplexu Cyt P450, jako např. ceruloplasmin. Právě proto byla měděná elektroda vybrána jako jedna z možných pracovních elektrod do elektrochemické cely konstruované pro spojení s ESI-MS. Navíc, jak bylo popsáno v rešeršní části, přítomnost měďnatého kationtu významně mění anti-oxidační vlastnosti **Res**.

Z chemického hlediska je měď velmi zajímavý prvek, který se řadí ke kovům přechodným, má volný *d* orbital, což jí umožňuje tvořit koordinačně-kovalentní vazbu sdílením těchto nevázaných (vakantních) orbitalů s volnými elektronovými páry ligandu. Existuje několik možných prostorových konfigurací pro komplexy mědi, od tetraedru po trigonální bipyramidu. Výsledná konfigurace závisí kromě charakteru ligandu (zejména na množství volných elektronových párů, kterými je k mědi vázán) i na oxidačním stavu mědi. Pro experimenty byla měď do vzorku přidávána buď jako CuCl_2 , tedy v oxidačním stavu Cu^{2+} , anebo docházelo k interakci **Res** (ale i jiných látek) na měděné pracovní elektrodě. Během

nebulizace, kdy je na zplyňovaný vzorek vkládáno napětí několika kilovoltů, však u volného (nebo slabě vázaného) Cu^{2+} dochází k redukci na Cu^+ , tedy se vyskytuje v detekovaných komplexech jako jednomocná (Tintaru *et al.* 2009). Zmíněná redukce Cu^{2+} však velmi závisí na charakteru ligandu a též na míře asociace s protiiontem pocházejícím z původní soli. Z experimentů (Jaklová Dytrtová *et al.* 2011a) vyplývá, že k redukci Cu^{2+} na Cu^+ nedochází, pokud: (i) vzniklý komplex obsahuje záporně nabitý anion (pochází buď z přidané soli, nebo vznikl z ligandu během nebulizace), (ii) ligand je veliký, (iii) počet ligandů obklopujících centrální měď je vyšší než čtyři. Jinými slovy to znamená, že se zde uplatňuje stabilizační efekt negativního náboje pocházející buď z protiiontu původní soli nebo z ligandu nesoucího negativní náboj, dále redukci Cu^{2+} brání stericky dostatečné množství ligandu.

3.2.1 Interakce resveratrolu na měděné elektrodě

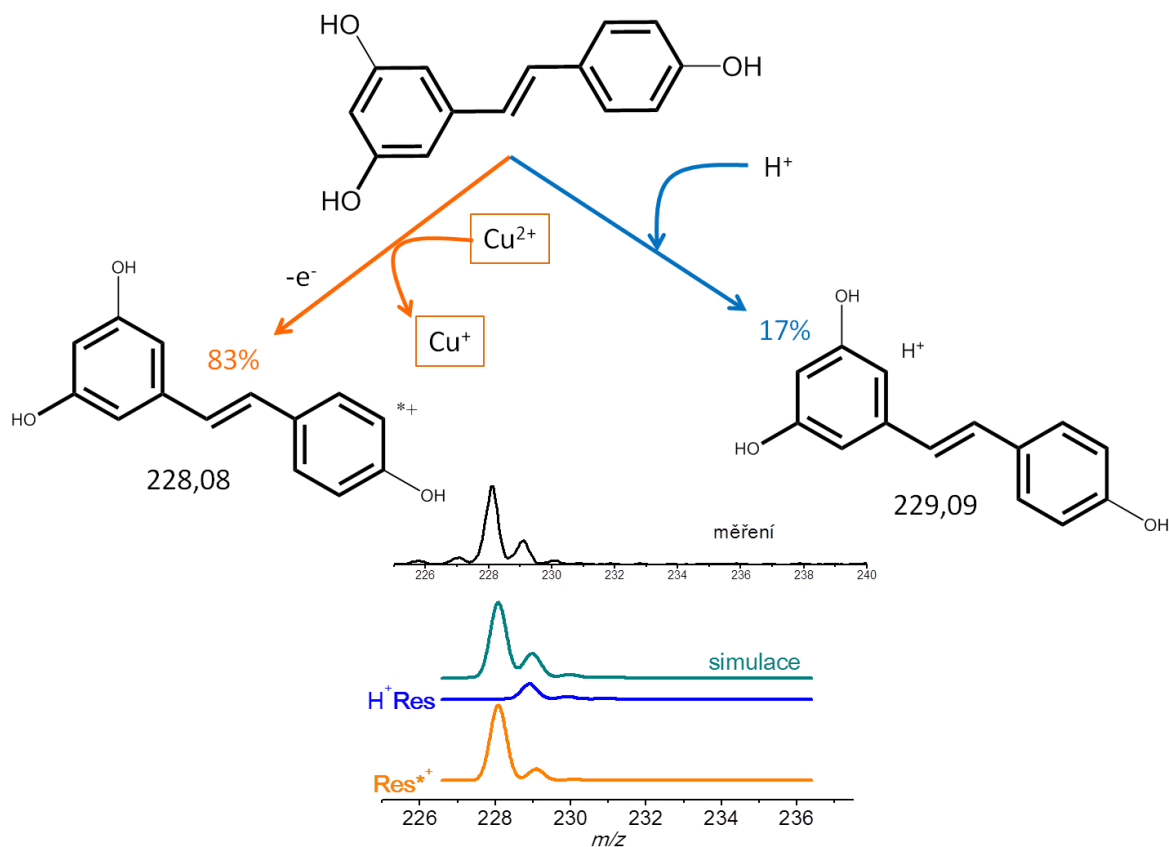
V hmotnostním spektru (**obr. 36**) získaném interakcí **Res** na měděné elektrodě (EC-ESI-MS) se nachází hned několik produktů **Res** vzniklých (i) ztrátou elektronu, (ii) interakcí s H^+ a (iii) interakcí s kationtem Cu. Čitelnost spektra lehce komplikuje neúplná konverze reakcí a také více možností vzniku produktů lišících se pouze o jeden vodík. Proto byly navržené produkty korigovány s výpočty, s dostupnou literaturou (citovanou v rešeršní části) a také za pomoci simulace a skládání spekter s pomocí programů Xcalibur, MS Excel a Origin.



Obr. 36. Hmotnostní spektrum v pozitivním modu produktů interakce resveratrolu (**Res**) $2,5 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹ na Cu elektrodě ve směsi ethanol/voda v poměru 1:1, měřeno pomocí EC-ESI-MS (zdroj: autorka).

V celkovém spektru pořízeném v pozitivním modu se vyskytuje (i) signál při 228/229, který náleží radikál kationtu **Res** (**Res*+**) při 228,08 a **Res** s H⁺ (**H⁺Res**) s přesnou hmotou 229,09, (ii) signál při 454/455, který náleží dimeru **Res** s jeho radikál kationtem (**Res-dimer*+**) s přesnou hmotou 454,14 a směsi dimerů **Res** s H⁺(**X**) s přesnou hmotou 455,15 a nakonec (iii) signálu 517/519 náležejícímu komplexům dimerů **Res** s Cu⁺ (**[Cu(X)]⁺**) s přesnou hmotou 517,07 a komplexu Cu⁺ s dvěma molekulami **Res** (**[Cu(Res)₂]⁺**) s přesnou hmotou 519,09.

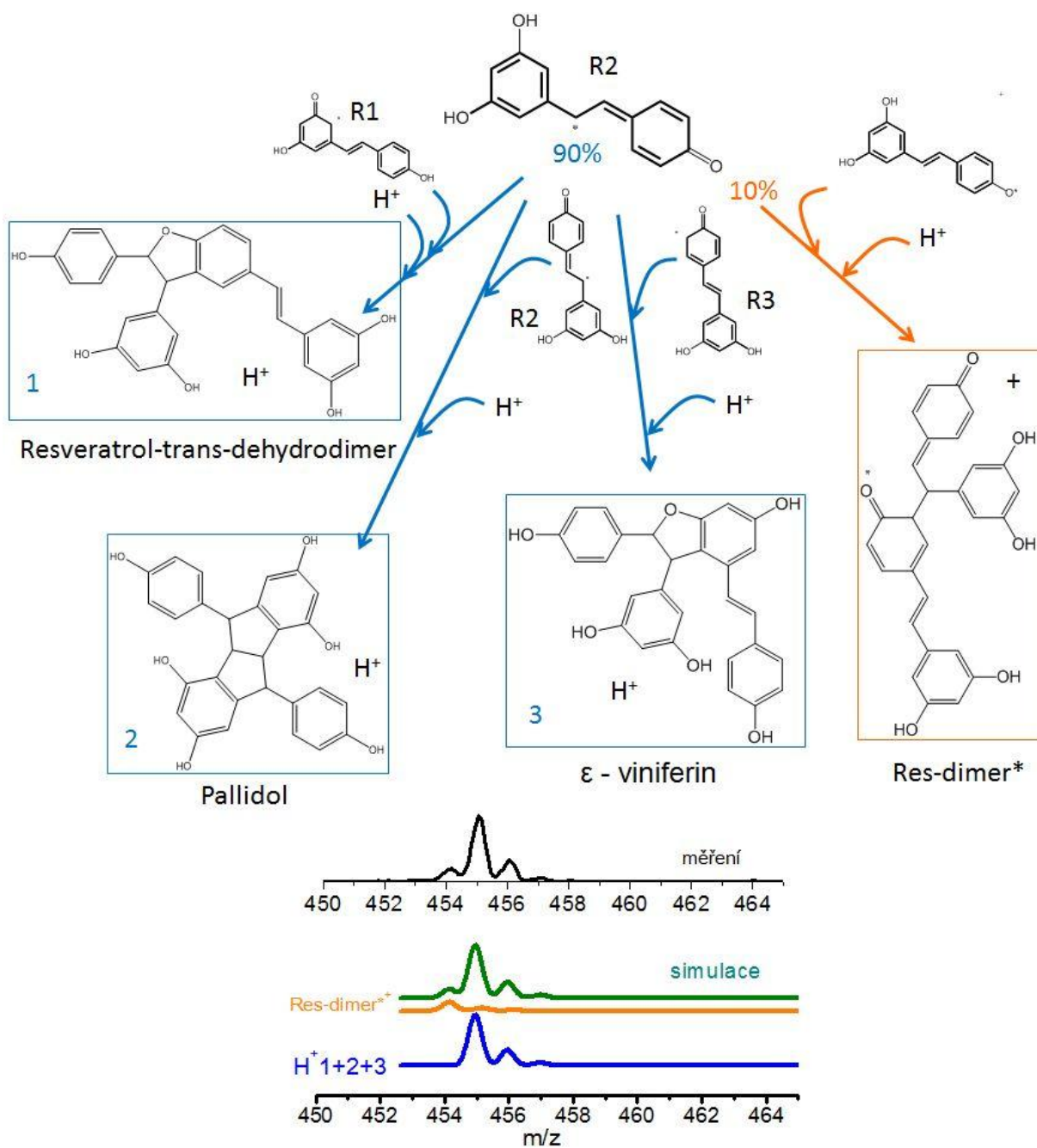
První signál (obr. 36) tedy náleží samotnému **Res** ve dvou formách, z nichž **Res*+** vzniká působením Cu²⁺ a v signálu převažuje (83%) a druhá (**H⁺Res**) forma **Res** vzniká adicí H⁺ a jeho vznik byl již popsán (Tamboli *et al.* 2011). Na **obr. 37** jsou uvedeny pravděpodobné cesty vzniku obou produktů oxidace **Res** společně se změřeným paternem signálu 228/229 a jeho simulací vzniklou složením paternů náležejících **Res*+** a **H⁺Res**.



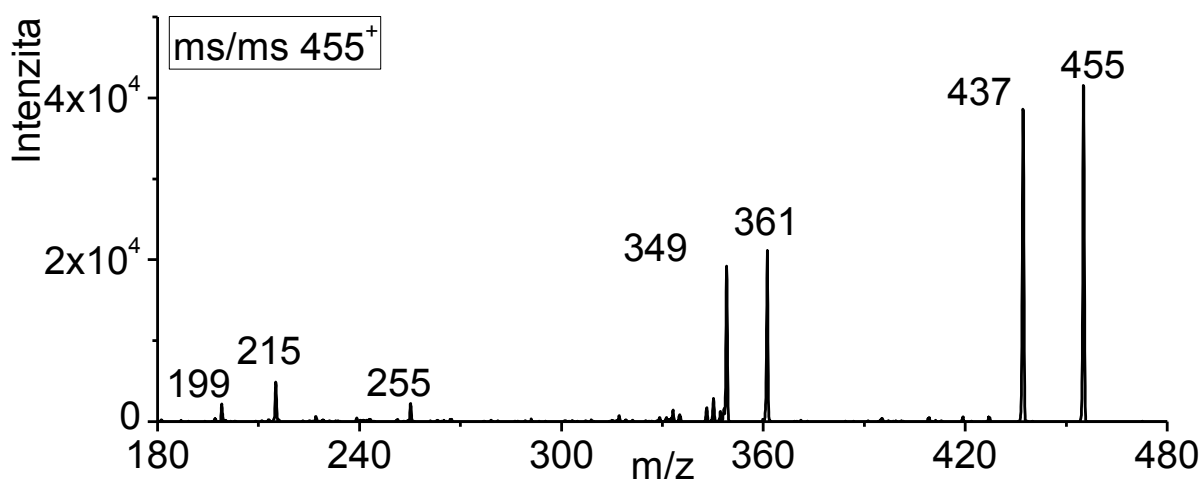
Obr. 37. Schéma pravděpodobného vzniku Res^{*+} (228,08) a H^+Res (229,09) včetně simulace změřeného paternu (zdroj: autorka).

Druhý signál (obr. 36) náleží směsi dimerů **Res** se sumárním vzorcem $\text{C}_{28}\text{H}_{22}\text{O}_6$ a přesné hmotě jeho aduktu s H^+ 455,15 a též radikál kationtu dimeru **Res** (Res-dimer^{*+}) s přesnou hmotou 454,14.

Struktury těchto dimerů **Res** se sumárním vzorcem $\text{C}_{28}\text{H}_{22}\text{O}_6$ byly nalezeny v souladu s citovanou literaturou (Takaya *et al.* 2005), přičemž na základě fragmentačních spekter (**obr. 39**) bylo zjištěno, že nejpravděpodobnějším dimerem je buď ϵ -viniferin (**3**) nebo resveratrol-trans-dehydrodimer (**1**).



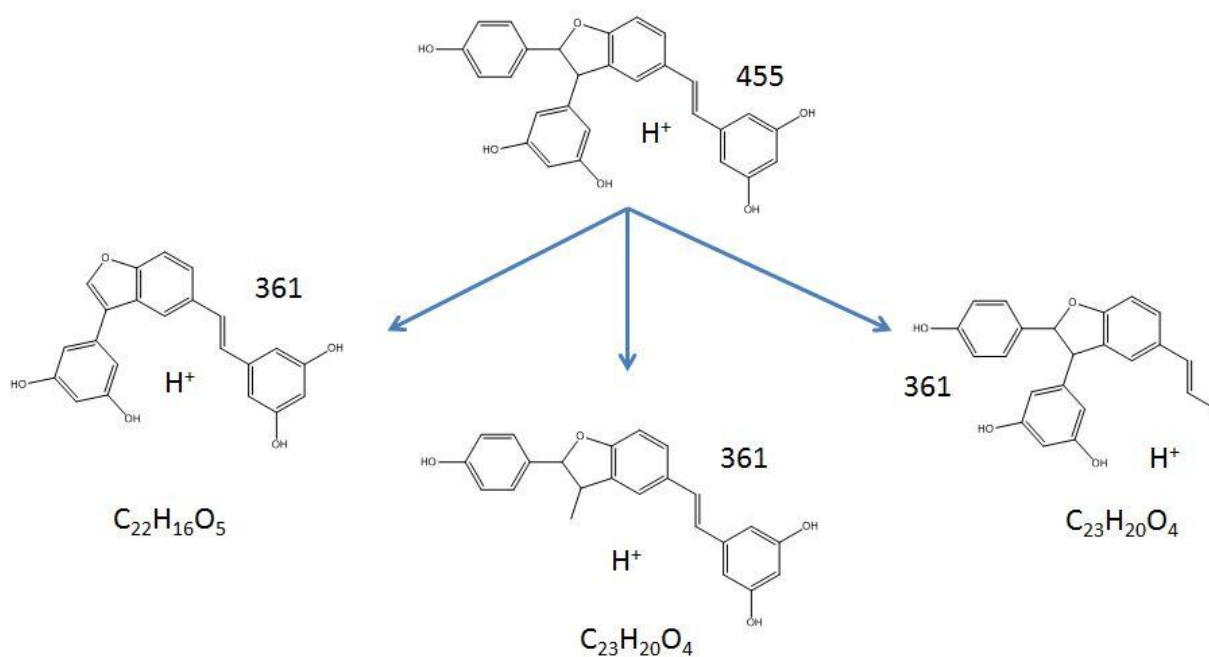
Obr. 38. Pravděpodobné schéma vzniku dimerů **Res** párováním (couplingem) radikálů včetně simulace změřeného paternu (zdroj: autorka).



Obr. 39. MS/MS fragmentační spektrum signálu 455 (náležející H^+ aduktům dimerů se sumárním vzorcem $C_{28}H_{22}O_6$) (zdroj: autorka).

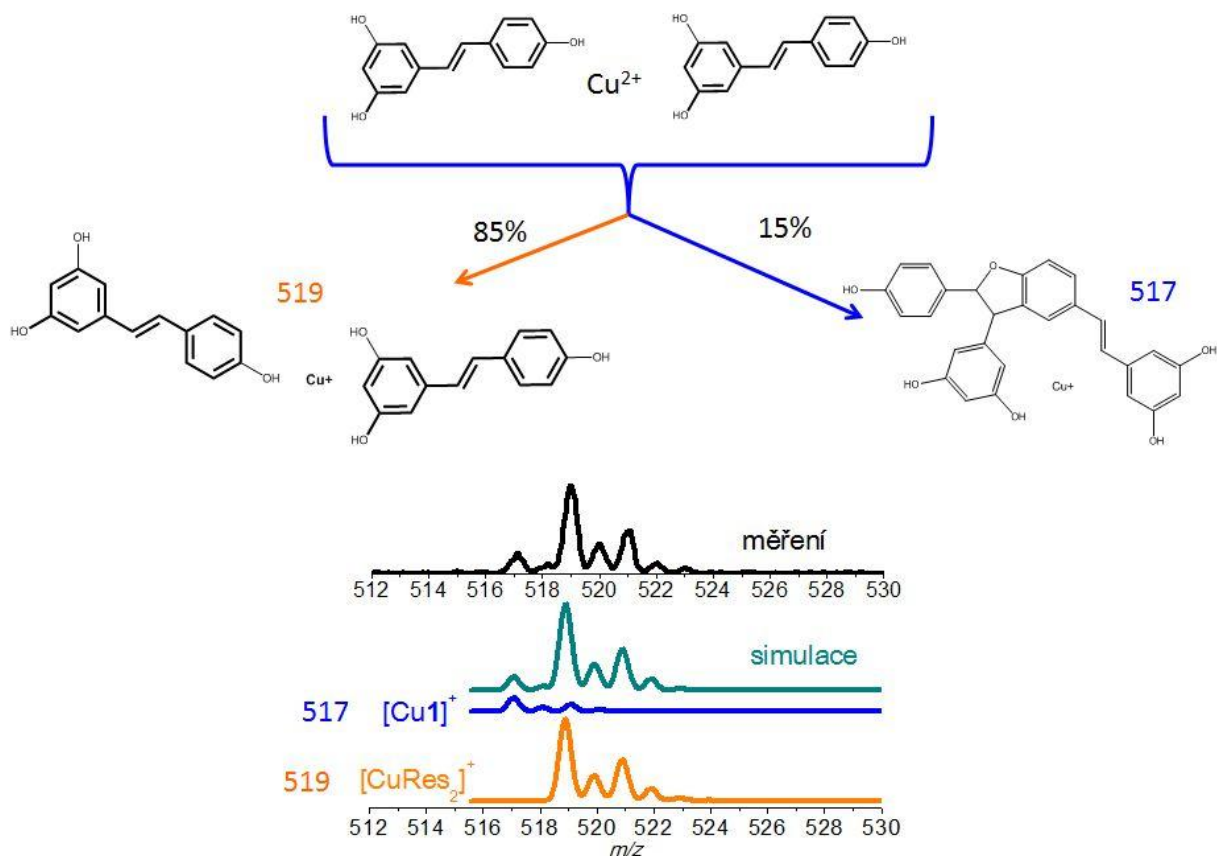
Na rozdíl od předešlé studie (Tamboli *et al.* 2011), která navrhuje, že dimer **Res** náleží pouze resveratrol-*trans*-dehydrodimeru (**1**) a uvažuje pouze vznik fragmentů 437 ztrátou molekuly vody a 361 ztrátou fenolu, z našich experimentů vyplývají i jiné možnosti. Pokud zohledníme, že i samotný fragment 361, tedy molekula nesoucí jeden náboj a o molekulové hmotnosti 361 g/mol může náležet různým molekulám (**obr. 40**), a to i za předpokladu, že rodičovským iontem byl resveratrol-*trans*-dehydrodimer, je zřejmé, že jednoznačné přiřazení struktur pouze za pomoci hmotnostních spekter není možné. Vzhledem k tomu, že v přírodě existuje celá řada dimerů **Res** (Takaya *et al.* 2005), dá se usuzovat, že ani využití výpočetních metod k určení energeticky nejstabilnějších struktur k výsledkům nepovede.

Možné struktury fragmentu 361⁺



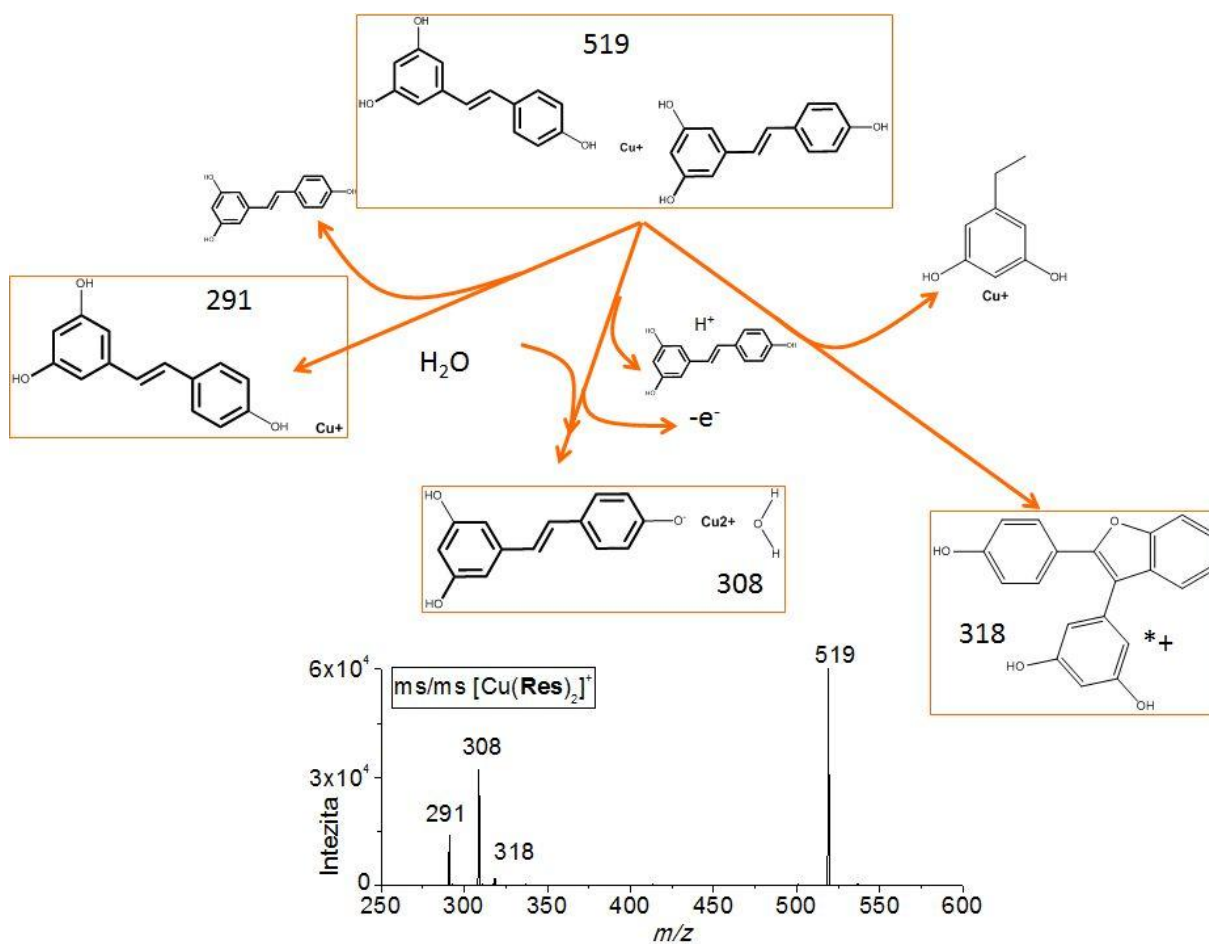
Obr. 40. Možné struktury fragmentů s m/z 361 vzniklé z resveratrol-*trans*-dehydrodimeru (zdroj: autorka).

Třetí signál (obr. 36) náleží paternu 517/519 (**obr. 41**), přičemž signál s přesnou hmotou 517,07 náleží komplexu dimerů se sumárním vzorcem C₂₈H₂₂O₆; **Res** s Cu⁺ [Cu(X)]⁺. Větší podíl třetího signálu (85%) s přesnou hmotou 519,09 náleží komplexu Cu⁺ s dvěma **Res** [Cu(Res)₂]⁺.



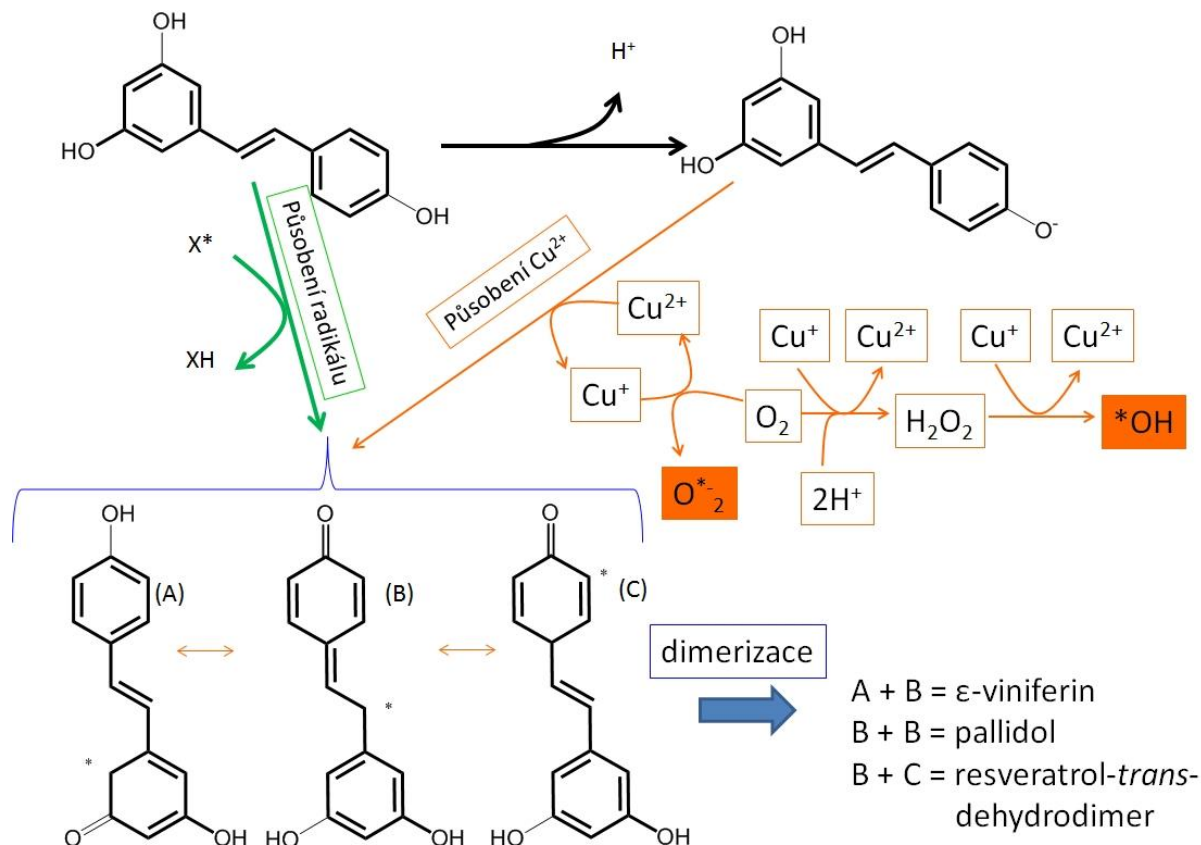
Obr. 41. Pravděpodobné schéma vzniku $\text{Cu}^+ [\text{Cu}(\text{X})]^+$ (15%) a komplexu Cu^+ s dvěma **Res** $[\text{Cu}(\text{Res})_2]^+$ (85%) včetně simulace změřeného paternu (zdroj: autorka).

Fragmentační m/z spektrum a sestavené pravděpodobné schéma (**obr. 42**) toto tvrzení potvrzuje. Během fragmentace vybraného signálu m/z 519 vznikají tři fragmenty. Fragment m/z 291 náležející komplexu $[\text{Cu}(\text{Res})_2]^+$ vzniká odštěpením jedné molekuly **Res**. Fragment m/z 308 vzniká odštěpením jedné molekuly **Res**, deprotonací zbylého navázaného **Res** (tedy vznik $(\text{Res}-\text{H})^-$) za současné oxidace Cu^+ na Cu^{2+} a adice vody. Fragment 318 vzniká nejprve vytvořením dimeru **Res** (byl uvažován resveratrol-trans-dehydrodimer) a následným odštěpením 5-etylbenzen-1,3-diolu v komplexu s Cu^+ .



Obr. 42. MS/MS fragmentační spektrum [Cu(Res)₂]⁺ a pravděpodobné schéma a struktura jeho fragmentů (zdroj: autorka).

Podle experimentů prováděných v plynné fázi pomocí (EC)/ESI-MS je tedy patrné, že měď katalyzuje (iniciuje) celou řadu přeměn **Res** (obr. 43). Pokud je **Res** osamocený, tak preferenčně vzniká deprotonovaný anion (**Res-H**)⁻, který si zachovává anti-oxidační vlastnosti. Působením Cu²⁺ nebo volného radikálu vzniká deprotonovaný radikál **Res** (**Res-H**)^{*}, který již nemá anti-oxidační vlastnosti, naopak na substrát bude působit spíše pro-oxidačně. Je však nutné zmínit, že díky delokalizaci nepárového elektronu není (**Res-H**)^{*} tak silným radikálem jako např. radikál kyslíku, nebo samotného hydroxyly. Radikály (**Res-H**)^{*} jsou ale dostatečně reaktivní, aby reagovaly mezi sebou. Vznikají tak dimery Res (jejich možné struktury jsou v souladu s (Takaya *et al.* 2005), zobrazeny na obr. 38. Tyto dimery (kromě **Res-dimer***) budou působit na substrát spíše anti-oxidačně. Podle doplňujících CID experimentů jsou pravděpodobně vzniklými dimery resveratrol-trans-dehydromer (jehož vznik v přítomnosti Cu²⁺ prokázal též (Tamboli *et al.* 2011)) a ε-viniferin.



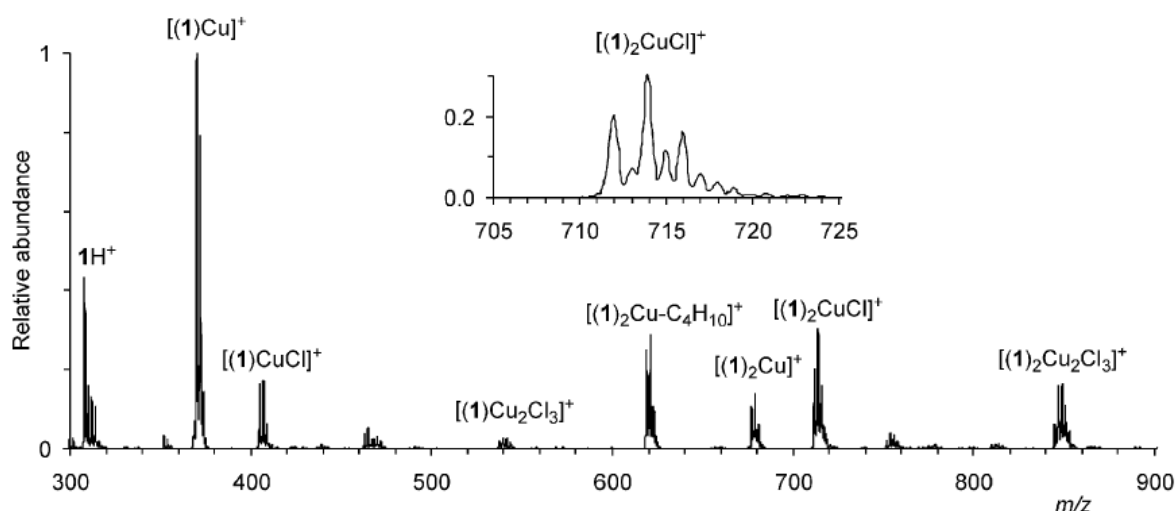
Obr. 43. Shrnutí možných reakcí samotného resveratrolu (**Res**) – reakce označené černou šipkou, dále působením radikálů (zelená šipka) a působením Cu^{2+} (oranžově). Modrá šipka označuje produkci dimerizace deprotonovaných radikálů **Res** (zdroj: autorka).

3.3 Interakce tebukonazolu s Cu^{2+}

Interakce tebukonazolu (**Teb**) s Cu^{2+} a na měděné elektrodě jsou podrobně popsány zejména v (Jaklová Dyrťtová *et al.* 2011a; Jaklová Dyrťtová *et al.* 2013); kdy byla ke studiu tohoto systému využita pouze ESI-MS a Cu^{2+} byla do vzorku přidána ve formě soli (CuCl_2) nebo byla použita EC-ESI-MS a tak vznikaly komplexy obsahující měď přímo na měděné elektrodě. Získané produkty interakcí se liší pouze přítomností komplexů s Cl^- v hmotnostních spektrech získaných pomocí ESI-MS, které se jako produkty interakce **Teb** na měděné elektrodě nevyskytují; jinak jsou výsledky komparativní.

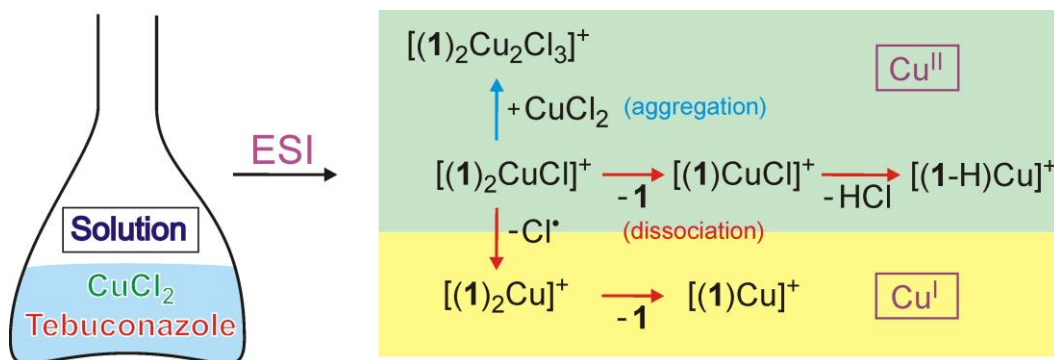
3.3.1 Interakce tebukonazolu s CuCl_2

V případě interakce CuCl_2 s **Teb** (obr. 44) (Jaklová Dyrťová *et al.* 2011a) vznikají buď komplexy $[\text{Cu}(\text{Teb})_x]^+$, (x je počet ligandů **Teb**) nebo komplexy, kde je měď redukována na Cu^+ . Druhým typem komplexů s **Teb** jsou komplexy obsahující chlorid, který chrání (brání redukcii) Cu^{2+} obecného vzorce $[\text{CuCl}(\text{Teb})_y]^+$, kde y nabývá hodnot 1 nebo 2 a také chlorido-měďnatých klastrů $[\text{Cu}_2\text{Cl}_3(\text{Teb})_z]^+$ (z=1, 2), které se dají považovat za adukty chloridu měďnatého s $[\text{CuCl}(\text{Teb})_y]^+$ komplexy. Dá se předpokládat, že právě tyto klastry v roztoku neexistují a jsou pouze důsledkem nebulizace. Na druhé straně $[\text{Cu}(\text{Teb})_x]^+$ i $[\text{CuCl}(\text{Teb})_y]^+$ se dají považovat za reálné komplexy i pro případ kapalné fáze.



Obr. 44. Hmotnostní spektrum získané interakcí CuCl_2 s tebukonazolem (**1**, **Teb**) v ekvimolárním množství $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (zdroj: autorka)

Na základě kolizních experimentů vybraných komplexů **Teb** s CuCl_2 (více v (Jaklová Dyrťová *et al.* 2011a)) bylo sestaveno degradační schéma těchto komplexů (obr. 45). Je z něj patrné, že $[\text{CuCl}(\text{Teb})_2]^+$ je původním komplexem, ze kterého jsou ostatní komplexy odvozeny. Na druhé straně nejstabilnějším komplexem je $[\text{Cu}(\text{Teb})_2]^+$ (212 kJ mol^{-1}).

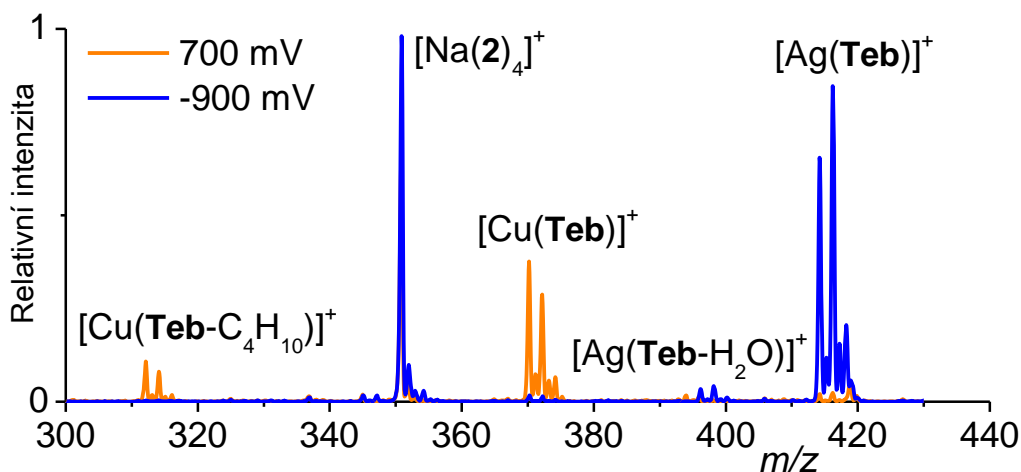


Obr. 45. Degradační schéma komplexů tebukonazolu (**1**, **Teb**) s CuCl₂, které se formují během nebulizace v elektrospreji (zdroj: autorka, vyhotovil: D. Schröder).

Pro případy pochopení stechiometrických změn byly studovány i interakce s kadmíem a zinkem (Jaklová Dytrtová *et al.* 2014).

3.3.2 Interakce tebukonazolu na měděné elektrodě

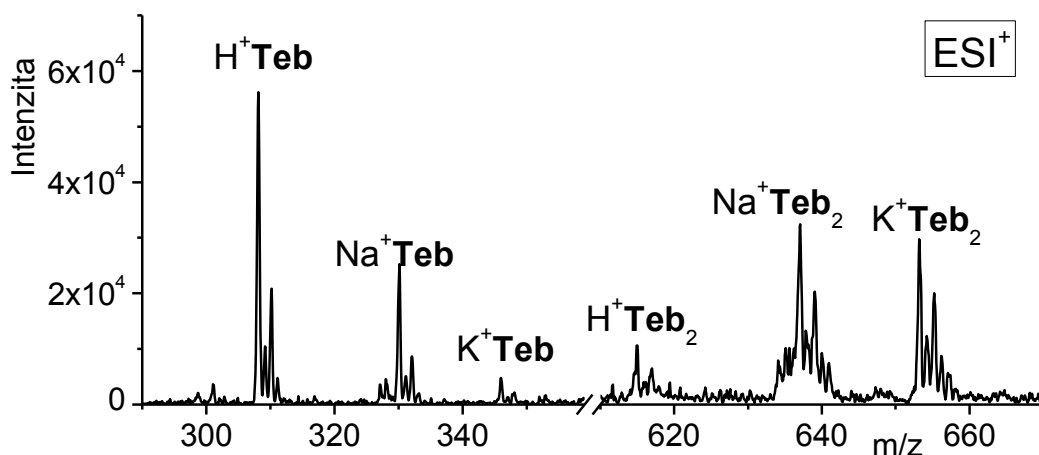
Interakcí **Teb** na měděné elektrodě (**obr. 46**) (Jaklová Dytrtová *et al.* 2013) vzniká pouze [Cu(**Teb**)]⁺ a jeho metabolit vzniklý ztrátou terc-butylu navázaného na chirální uhlík. Interakce byla studována v dvouelektrodové elektrochemické cele, kde kromě měděné pracovní elektrody byla stříbrná pseudoreferentní elektroda, tedy pouhou změnou znaménka u potenciálu (nebo prohozením elektrodového zapojení) bylo možné studovat interakce se stříbrnou elektrodou. Na stříbrné elektrodě vznikal podobný komplex s **Teb**, tj. [Ag(**Teb**)]⁺, nicméně nalezený metabolit byl jiný, jednalo se o dehydrataci (ztrátu vody) **Teb**. Z toho plyne, že použitý elektrodový materiál má zásadní vliv na charakter tvorby metabolitů.



Obr. 46. Složená spektra získaná interakcí tebukonazolu (**Teb**) s měděnou (*oranžově*) a stříbrnou (*modře*) elektrodou. Signál $[\text{Na}(\mathbf{2})_4]^+$ náleží základnímu elektrolytu (octan sodný) a byl využit jako referenční signál pro výpočet množství vzniklých komplexů s **Teb** (zdroj: autorka).

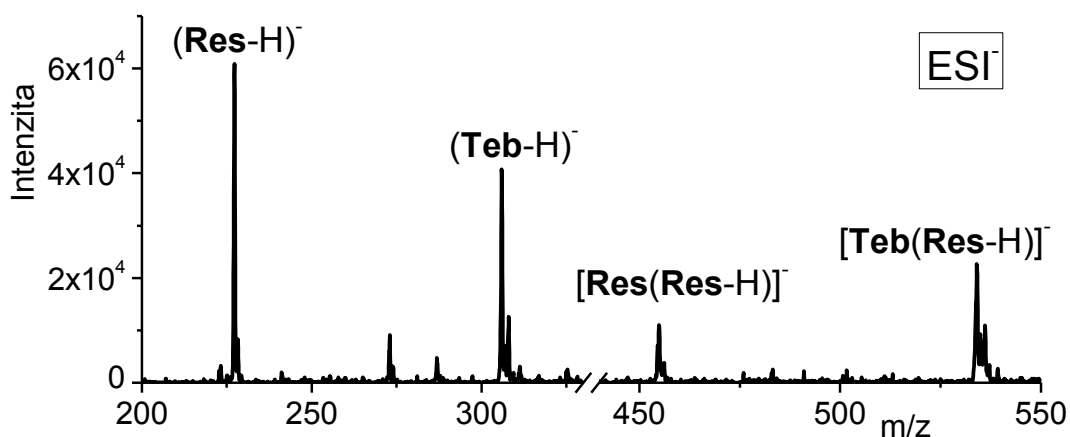
3.4 Interakce resveratrolu s tebukonazolem

Jak již bylo nastíněno v rešeršní části této práce, **Res** se přirozeně vyskytuje především ve víně, jehož nedílnou součástí je kromě solí mědi také **Teb** (Jaklová Dyrtrtová *et al.* 2014; Jaklová Dyrtrtová *et al.* 2011a; Jaklová Dyrtrtová *et al.* 2013). Vzájemná interakce **Res** a **Teb** je pravděpodobná, proto byly provedeny experimenty nejprve pomocí ESI-MS, kdy vzorek obsahoval ekvimolární množství **Res** a **Teb** ($2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). V pozitivním modu (ESI^+) se ve spektru žádný adukt **Res** a **Teb** nevyskytoval (*obr. 47*); ve spektru jsou přítomny pouze adukty **Teb** s H^+ , Na^+ , K^+ , které jsou v případě ESI^+ ionizace běžné. Analogické adukty **Res** s H^+ , Na^+ a K^+ se ve spektru ESI^+ nevyskytovaly, stejně jako v případě, kdy byl **Res** studován samostatně.

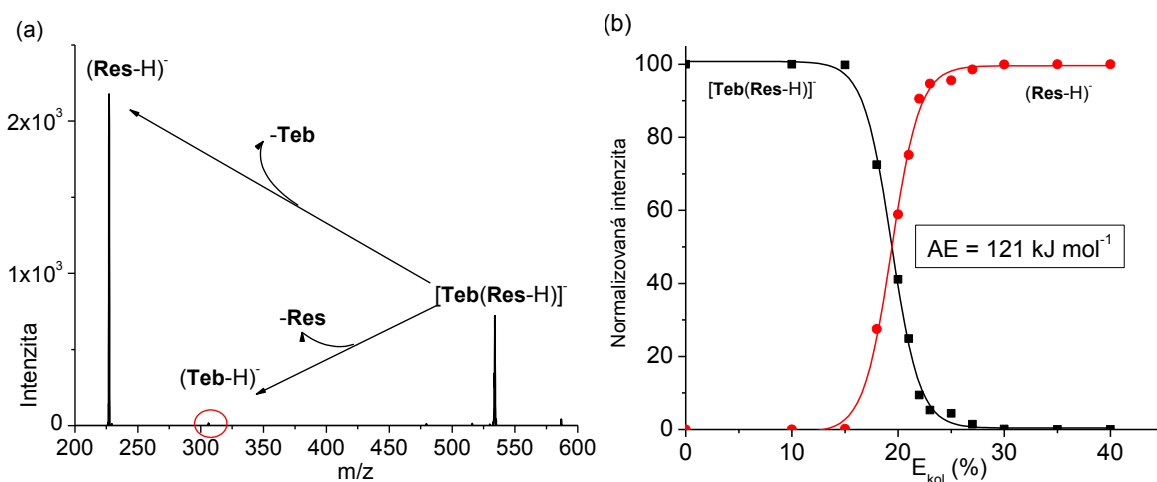


Obr. 47. Spektrum v pozitivním modu vzorku obsahujícího ekvimolární ($2,5 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹) množství resveratrolu (**Res**) a tebukonazolu (**Teb**) ve směsi (1:1) rozpouštědel ethanol/voda (zdroj: autorka).

Důkaz o interakci **Res** a **Teb** se nachází až v negativním modu (ESI⁻) se již nacházejí kromě aduktů **Teb** i adukty **Res** (**obr. 48**). Nachází se zde jak deprotonovaný **Res** (**Res-H**)⁻, tak deprotonovaný **Teb** (**Teb-H**)⁻ dále potom dimer **Res** [**Res(Res-H)**]⁻, který formálně obsahuje jeden neutrální **Res** a jeden deprotonovaný; stejný byl nalezen v ESI⁻ i samotného **Res**. Nachází se zde i předpokládaný adukt **Res** s **Teb**, tj. [**Teb(Res-H)**]⁻. Vzhledem k tomu, že **Res** i **Teb** se ve vzorku nacházelo stejné množství, ale intenzita (**Teb-H**)⁻ byla vzhledem k intenzitě (**Res-H**)⁻ a intenzitě [**Res(Res-H)**]⁻ nižší, dá se usuzovat, že ochota **Teb** odštěpit proton je nižší než u **Res**. Tuto domněnku potvrzuje i velikost pK_a; u **Res** (pK_{a1} = 8.8, pK_{a2} = 9.8, pK_{a3} = 11.4, (Lopez-Nicolas a Garcia-Carmona 2008)) a u **Teb** (pK_a = 1,57 (Konášová *et al.* 2015)) a také fragmentační spektrum ms/ms vybraného iontu [**Teb(Res-H)**]⁻ s přesnou hmotou 534,22 (**obr. 49a**). Proto se formálně jedná o adukt (**Res-H**) a **Teb**, kdy energie jeho rozpadu (odštěpnutí **Teb**) je 121 kJ mol⁻¹ viz CID spektrum (**obr. 49b**).



Obr. 48. Spektrum v negativním modu vzorku obsahujícího ekvimolární ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) množství resveratrolu (**Res**) a tebukonazolu (**Teb**) ve směsi (1:1:2) rozpouštědel ethanol/methanol/voda (zdroj: autorka)



Obr. 49. (a) Fragmentační CID ms/ms spektrum a (b) závislost intenzit aduktu tebukonazolu (**Teb**) s resveratolem (**Res**) [**Teb(Res-H)]** a dceřiného iontu (**Res-H**)⁻ na kolizní energii (zdroj: autorka).

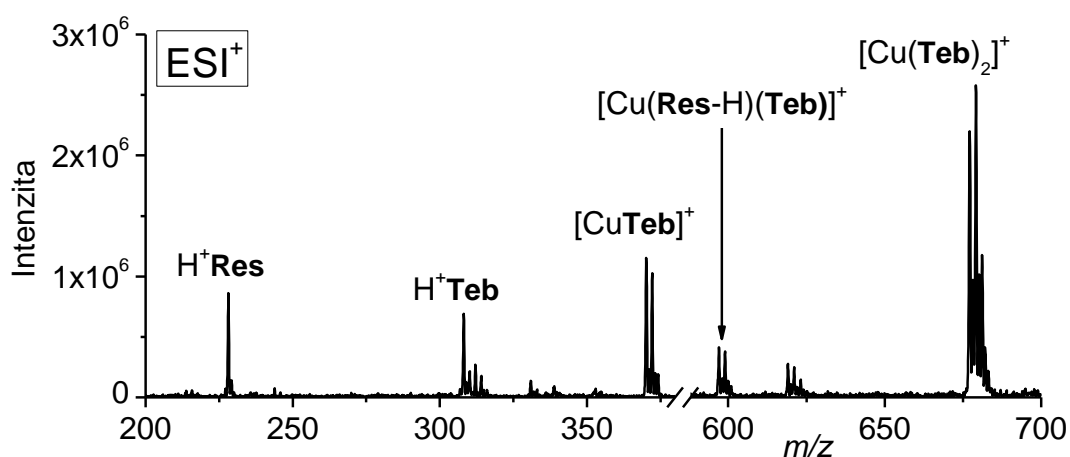
Významným faktem je, že se ani v jednom ze spekter nevyskytoval radikál **Res**. Znamená to tedy, že vznik radikálů **Res** není **Teb** podporován. Otázkou zůstává, zda by mohl **Teb** bránit vzniku radikálů **Res**, proto bylo třeba též studovat systém **Teb**, **Res** a Cu^{2+} , kde se vlivem přítomnosti Cu^{2+} dají radikály **Res** očekávat.

3.5 Interakce resveratrolu s tebukonazolem a Cu^{2+}

Interakce **Res-Teb-Cu²⁺** jsou nejsložitějším systémem, jaký byl v této práci studován. Autorce je ovšem jasné, že víno (hroznová šťáva), natož potom živý organismus jsou systémy ještě složitější. Přesto odhalení možných a velice pravděpodobných interakcí mezi takto významnými komponentami za kontrolovaných a více méně známých podmínek může napomoci pochopit, jak se může chovat **Res** v případě, že se v jeho okolí nachází jak **Teb**, tak i Cu^{2+} . Systém byl studován dvěma způsoby: (i) s použitím pouze ESI-MS, kdy byla Cu^{2+} přidána do vzorku obsahující **Teb** a **Res** ve formě soli CuCl_2 a (ii) kdy byl vzorek obsahující **Teb** a **Res** nechán reagovat na Cu elektrodě, tedy s použitím EC-ESI-MS.

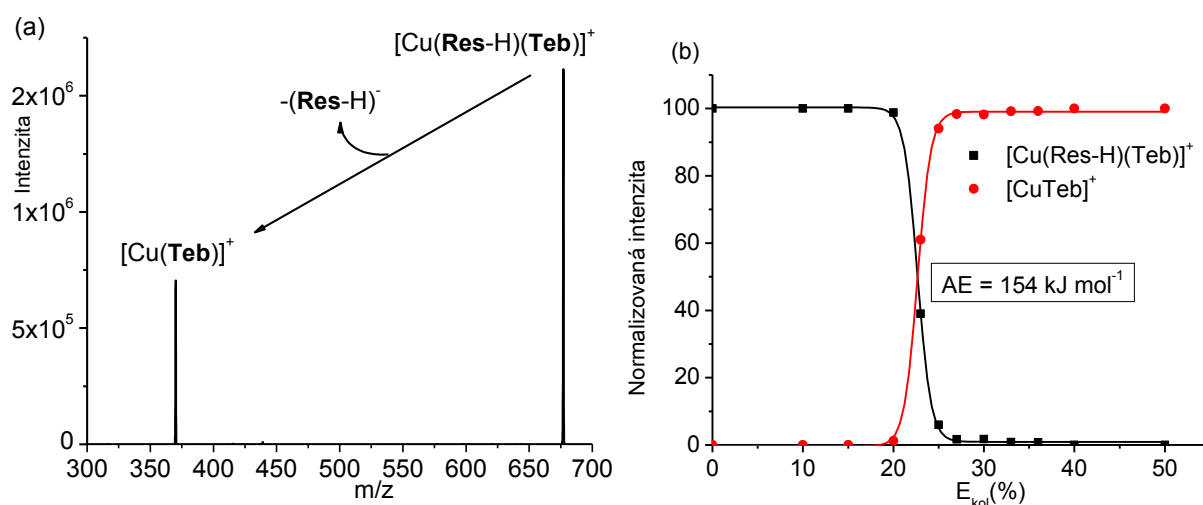
3.5.1 Interakce resveratrolu s tebukonazolem a CuCl_2

Spektrum směsi **Res**, **Teb** a CuCl_2 v pozitivním modu (**obr. 50**) ukazuje vznik několika typů komplexů a aduktů: především jsou to (i) protonované formy **Res** a **Teb** (H^+Res a H^+Teb), které se v ESI^+ modu dají očekávat, dále jsou to (ii) komplexy **Teb** s Cu^+ ($[\text{Cu}(\text{Teb})_{1,2}]^+$), které jsou podobně popsány v publikaci (Jaklová Dytrtová *et al.* 2011a) a konečně (iii) komplex s Cu^{2+} obsahující **Teb** a (Res-H), tj. $[\text{Cu}(\text{Res-H})(\text{Teb})]^+$.



Obr. 50. Spektrum v pozitivním modu ekvimolárního množství ($2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) resveratrolu (**Res**), tebukonazolu (**Teb**) a CuCl_2 ve směsi (1:1:2) rozpouštědel ethanol/metanol/voda (zdroj: autorka)

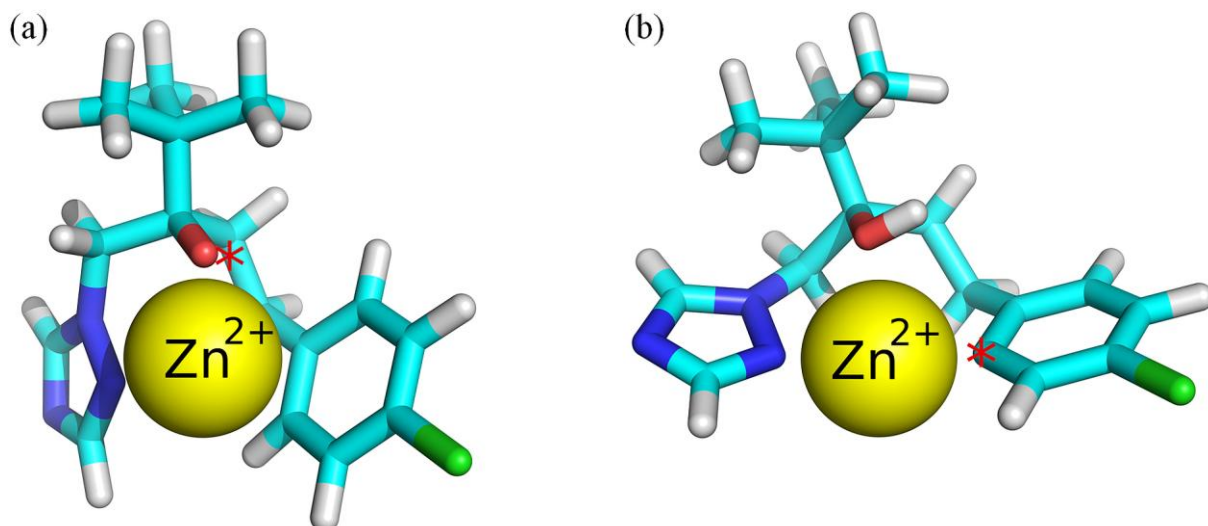
Identita výše zmíněných komplexů byla potvrzena jak na základě shody izotopového otisku (paternu) ze simulací, tak i pomocí fragmentačních spekter a jejich závislostí na kolizní energii (E_{kol}). Na první pohled je zajímavé, že se v ESI^+ vyskytuje H^+Res , který se v přítomnosti **Teb** nevyskytuje (obr. 47), ale v přítomnosti Cu^{2+} již ano (obr. 35). Obr. 51a s fragmentačním spektrem ms/ms vybraného $[Cu(Res-H)(Teb)]^+$ s přesnou hmotou 597,15 a obr. 51b ukazují závislost intenzity původního (rodičovského) iontu $[Cu(Res-H)(Teb)]^+$ na kolizní energii. Energie rozpadu (odštěpení $[CuTeb]^+$) byla určena na 154 kJ mol^{-1} .



Obr. 51. (a) Fragmentační ms/ms CID spektrum a (b) závislost intenzit aduktu $[Cu(Res-H)(Teb)]^+$ a jeho fragmentu (dceřiného iontu) na kolizní energii (E_{kol}) (zdroj: autorka)

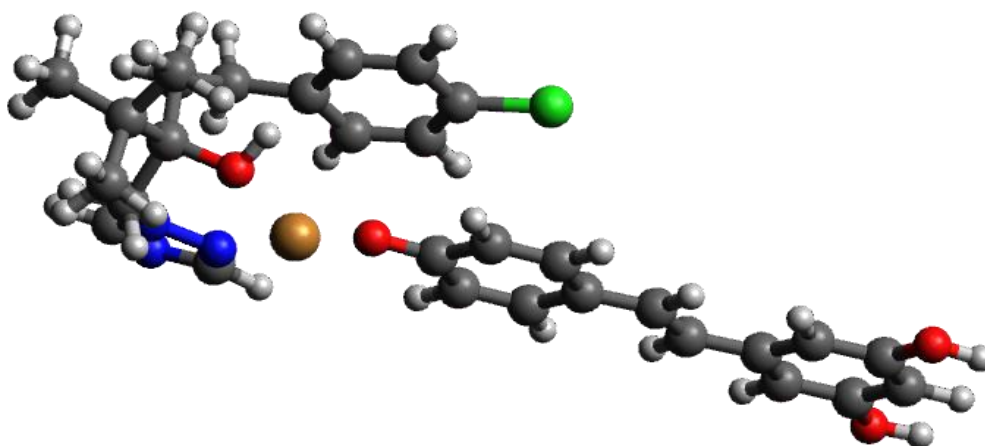
$[Cu(Res-H)(Teb)]^+$ komplex je zajímavý především ze dvou důvodů: (i) měď se v něm vyskytuje jako Cu^{2+} , tj. zatím nemohla iniciovat tzv. Fentonovou reakci vedoucí ke vzniku **Res** radikálů, a (ii) **Res** se zde vyskytuje jako deprotonovaný (tedy jako potenciálně možný anti-oxidant). Výskyt dvoumocné mědi, navzdory malému počtu malých ligandů (Tintaru *et al.* 2009), je patrně způsoben (kompenzován) přítomností záporně nabitého ligandu, tj. $(Res-H)^-$, který vyšší mocenství Cu stabilizuje (Jakl *et al.* 2017). Přítomnost $(Res-H)^-$ je velmi překvapivá, protože Cu^{2+} jeho deprotonaci brání (viz předchozí kapitoly a Fentonova reakce). Dá se tedy usuzovat, že deprotonaci **Res** podporuje **Teb**. Z tohoto pohledu má přítomnost **Teb** jasně pozitivní účinek, protože stabilizuje anti-oxidační formaci **Res**. Nicméně je nutno zdůraznit, aby k tomuto efektu došlo, musí **Teb** vytvořit nejprve adukt s **Res** a až následně

tento adukt nechat interagovat s Cu^{2+} , případně musí dojít nejprve k vytvoření komplexu $\text{Teb}/\text{Cu}^{2+}$ a teprve následně reagovat s $(\text{Res-H})^-$. Tento předpoklad je v případě směšného vzorku založen jak na pravděpodobnosti, tak i na vzájemných afinitách jednotlivých komponent vzorku. Z fragmentačních spekter (**obr. 51a**) je vidět, že se $[\text{Cu}(\text{Res-H})(\text{Teb})]^+$ komplex rozpadá na $[\text{CuTeb}]^+$ a pravděpodobně $(\text{Res-H})^*$, který však není v pozitivním modu viditelný. Energeticky je tomuto rozpadu nutno přispět energií 154 kJ mol^{-1} a odpovídá to rozpadu vazby mezi Cu^{2+} s $(\text{Res-H})^-$ a zároveň redukcí Cu^{2+} na Cu^+ a vzniku $(\text{Res-H})^*$. Z předchozí publikace (Jaklová Dyrťová *et al.* 2014) je známo, že **Teb** se váže na centrální dvoumocný kation třemi způsoby: (i) přes volné elektronové páry lokalizované na kyslíku hydroxylové skupiny, (ii) přes 2N triazolového cyklu a (iii) π – elektrony benzenového cyklu. Cu^+ a **Teb** se váží velmi pevně a za podmínek indukovaných kolizí (CID) ji nebylo možné experimentálně stanovit. Během kolizních experimentů s $[\text{CuTeb}]^+$ docházelo ke vzniku $[\text{CuTeb-H}_2\text{O}]^+$, tedy ke ztrátě molekuly vody ze struktury **Teb**, která vyžadovala 224 kJ mol^{-1} (Jaklová Dyrťová *et al.* 2011a). Velmi pevná vazba **Teb** k Cu^+ má za následek i prostorovou deformaci molekuly **Teb**, kdy dojde ke zmenšení povrchu komplexu $[\text{CuTeb}]^+$ v porovnání se samotnou molekulou **Teb**. $[\text{CuTeb}]^+$ má tedy povrch blížíící se tvaru koule. Struktury vypočítané pomocí DFT metod pro analogický komplex $[\text{ZnTeb-H}]^+$ jsou znázorněny na **obr. 52** a energeticky se liší jen o necelých 11 kJ mol^{-1} (Jaklová Dyrťová *et al.* 2014). V případě analogického komplexu se Zn^{2+} však dochází k deprotonaci **Teb**, oproti tomu v případě komplexu s Cu^+ je naopak energeticky výhodnější redukce Cu^{2+} na Cu^+ . Právě díky snadné redukcí Cu^{2+} na Cu^+ je provedení výpočtů velmi obtížné a zabralo neúměrně mnoho času. Z tohoto důvodu se pokoušíme struktury s $\text{Cu}^{2+,+}$ ve výpočtech nahradit právě Zn^{2+} a výsledek potom s pomocí experimentů korigovat.



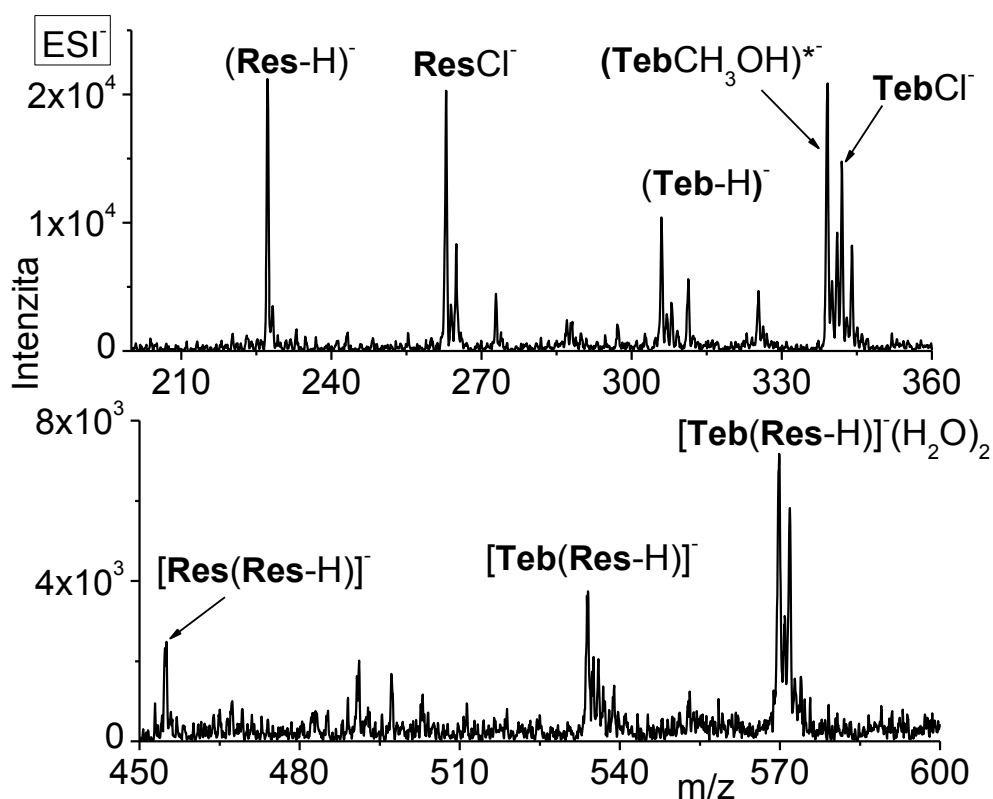
Obr. 52. Znázornění prostorové deformace molekuly **Teb** v důsledku vazby na centrální kation, vypočítáno pomocí DFT metod, (a) k deprotonaci dochází na OH skupině, (b) na benzenovém kruhu, tyrkysová-uhlík, zelená-chlór, červená-kyslík, modrá-dusík, bílá-vodík, (zdroj: autorka, vyhotovil J. Fanfrlík)

Na základě informací, které jsou známé z předchozích prací, je možné usuzovat, že v komplexu $[\text{Cu}(\text{Res-H})(\text{Teb})]^+$ se **Teb** na Cu^{2+} (a následně na Cu^+) váže třemi výše zmíněnými způsoby, na rozdíl od **Res**, který se na Cu^{2+} váže pouze přes elektron lokalizovaný na deprotonované OH skupině (**obr. 53**).



Obr. 53 Předpokládaná struktura komplexu $[\text{Cu}(\text{Res-H})(\text{Teb})]^+$ na základě DFT výpočtů (zdroj: autorka, vyhotovil M. Straka)

Je zajímavé, že v negativním modu (**obr. 54**) se nenachází žádný komplex s kationtem mědi. Kromě (i) deprotonovaného **Res** a **Teb** ($(\text{Res-H})^-$ a $(\text{Tes-H})^-$), též dimer **Res** ($\text{Res}/\text{Res-H}^-$), (ii) dále se ve spektru nachází adukty obou látek s Cl^- (ResCl^- , TebCl^-), a (iii) též dimer **Teb**/ $(\text{Res-H})^-$ i jeho adukt s vodou $\text{Teb}/(\text{Res-H})^- (\text{H}_2\text{O})_2$, který dokládá vzájemnou afinitu těchto dvou biologicky aktivních látek. (iv) velmi zajímavý je radikál anion **Teb** jako adukt s CH_3OH ($\text{TebCH}_3\text{OH}^{\bullet-}$), jehož signál (tedy jeho koncentrace) ve spektru není vysoká, ale dokládá existenci tzv. Fentonovy reakce způsobené přítomností Cu^{2+} (**obr. 43**) projíhající na OH skupině methanolu.

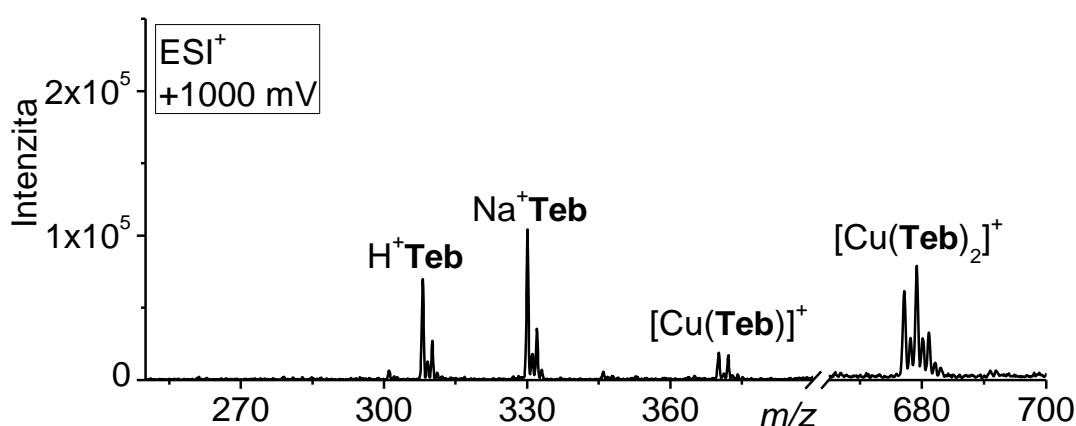


Obr. 54. Hmotnostní spektrum v negativním modu ekvimolární ($2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) směsi resveratrolu (**Res**), tebukonazolu (**Teb**) a CuCl_2 ve směsi rozpouštědel EtOH/MeOH/ H_2O (1:1:2) (zdroj: autorka)

3.5.2 Interakce resveratrolu s tebukonazolem na měděné elektrodě

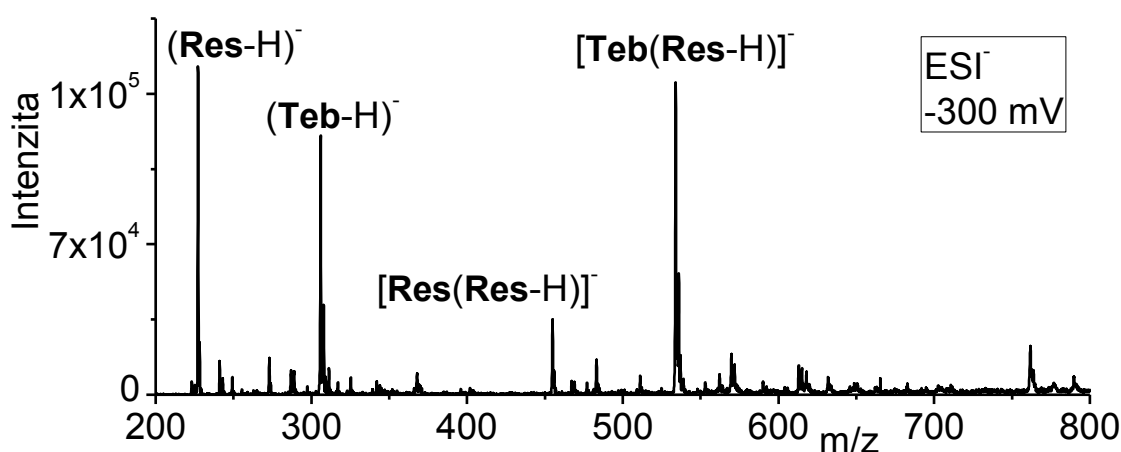
Vzorek sestávající s ekvimolárního ($2,5 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹) množství **Teb** a **Res** byl studován v systému EC-ESI-MS s měděnou pracovní elektrodou. Byly využity oba ionizační módy ESI v kombinacích s pozitivním i záporným vkládaným potenciálem na pracovní elektrodu.

Hmotnostní spektrum získané v pozitivním modu za současně vkládaného kladného potenciálu na měděnou elektrodu (oxidace $\text{Cu}^0 \rightarrow \text{Cu}^+ \rightarrow \text{Cu}^{2+}$) je na **obr. 55**. Toto spektrum by mělo být podobné spektru v pozitivním modu vzorku obsahujícího ekvimolární ($2,5 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹) množství resveratrolu (**Res**), tebukonazolu (**Teb**) a CuCl_2 (**obr. 50**), ale není. Na spektru získaném pomocí EC-ESI-MS v pozitivním modu (**obr. 55**) se např. vůbec nenachází produkt obsahující **Res**, jsou zde přítomny pouze adukty **Teb** s H^+ , Na^+ a Cu^+ : (H^+Teb , Na^+Teb , $[\text{Cu}(\text{Teb})_{1,2}]^+$). Tento fakt lze vysvětlit různým reakčním schématem obou experimentů. V případě, kdy byla zdrojem Cu^{2+} měděná elektroda (EC/ESI-MS) a přiváděný vzorek obsahovat **Res** i **Teb** došlo při přípravě vzorku nejprve k interakci **Teb** s **Res** a vytvoření aduktu $[\text{Teb}(\text{Res}-\text{H})]^-$, ve vzorku byly ale přítomny četné specie náležející samotnému **Res** a **Teb**. **Teb** má enormní afinitu vůči mědi a je k ní vázán přes 2N triazolového cyklu, OH skupinu a π -elektrony fenolového cyklu; tato vazebná místa jsou v případě $[\text{Teb}(\text{Res}-\text{H})]^-$ aduktu z velké části blokována navázaným **Res**. $[\text{Teb}(\text{Res}-\text{H})]^-$ adukt tedy nemá dostatečnou schopnost na tvorbu komplexu s Cu^{2+} . Komplex $([\text{CuTeb}(\text{Res}-\text{H})]^+)$ může být vytvořen pouze v případě, že je ve směsi přítomen současně **Res**, **Teb** i Cu^{2+} (např. přidán jako CuCl_2). Vytvoří se tak komplex $[\text{CuTeb}(\text{Res}-\text{H})]^+$, kdy se **Res** a **Teb** na centrální Cu^{2+} váží z obou stran (**obr. 53**).



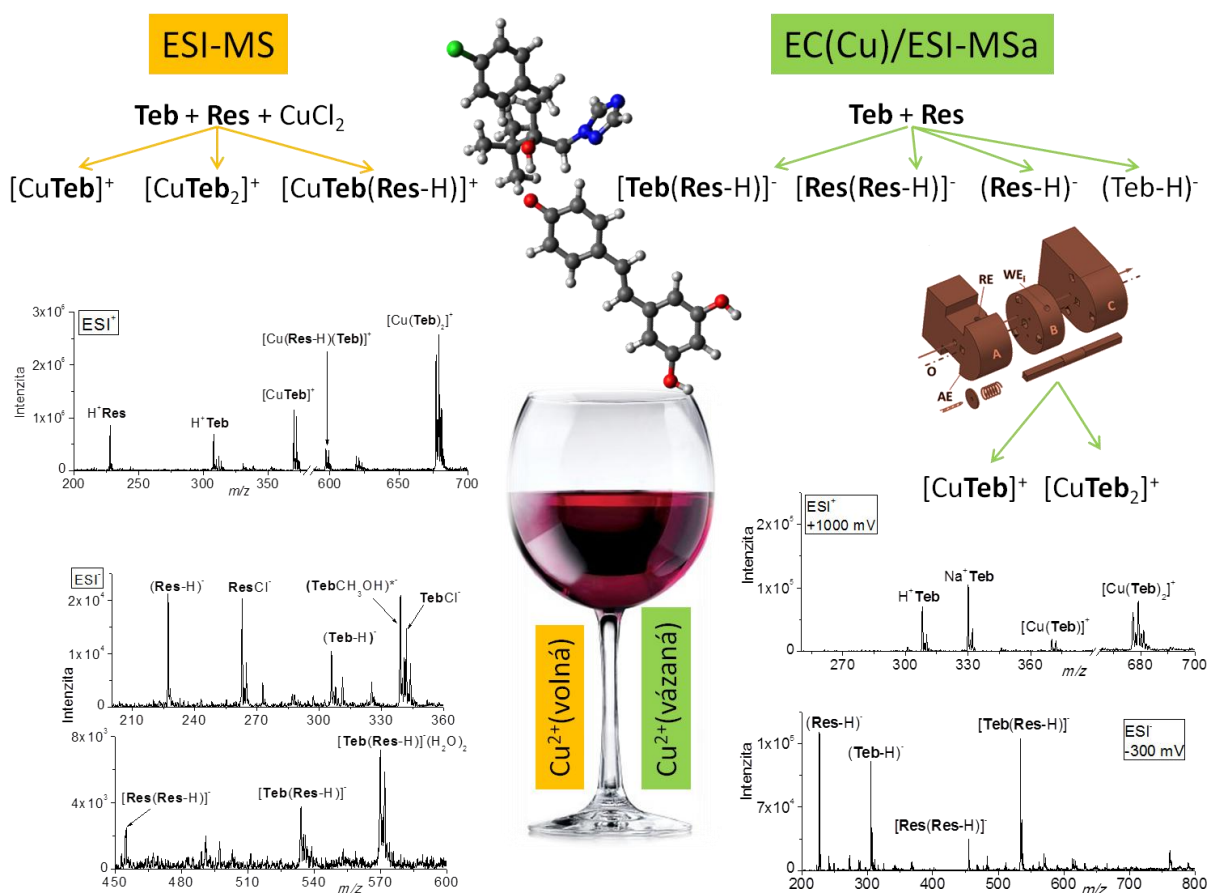
Obr. 55. Spektrum v pozitivní modu získané pomocí EC/ESI-MS, při vkládaném potenciálu 1000 mV na měděnou pracovní elektrodu. Ekvimolární ($2,5 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹) směs resveratrolu a tebukonazolu (**Teb**) v rozpouštědle MeOH/EtOH/H₂O (1:1:2) (zdroj: autorka).

Obr. 56 ukazuje hmotnostní spektrum v negativním modu, kdy byl na pracovní elektrodu vkládán záporný potenciál (-300 mV). Protože během doby, kdy byl na pracovní elektrodu vkládán potenciál, nejen, že nedocházelo k uvolňování kationtů mědi do roztoku, ale také docházelo k redukci vhodných látek naadsorbovaných na pracovní elektrodu během předchozích měření. Proto by toto spektrum mělo být velmi podobné spektru na **obr. 47**, tj. spektrum v negativním modu vzorku obsahujícího ekvimolární ($2,5 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹) množství **Res** a **Teb**. Obě spektra shodně obsahují deprotonované formy obou biologicky aktivních látek a jejich dimery ((**Res**-H)⁻, (**Teb**-H)⁻, [**Res**(**Res**-H)]⁻ a ([**Teb**(**Res**-H)]⁻).



Obr 56. Spektrum v negativním modu získané pomocí EC/ESI-MS, při vkládaném potenciálu -300 mV na měděnou pracovní elektrodu. Vzorek je ekvimolární ($2,5 \cdot 10^{-5}$) směs resveratrolu (**Res**) a tebukonazolu (**Teb**) v rozpouštědle MeOH/EtOH/H₂O (1:1:2)

Schématické srovnání obou experimentálních přístupů ukazuje **obr. 57**. Experimentální přístup založený na ESI-MS, kdy jsou do reakční směsi přidávány současně **Res**, **Teb** a CuCl₂ simuluje systém, kde se tyto tři látky vyskytují jako volné. Experimentální uspořádání EC(Cu)/ESI-MS umožňuje simulovat systém, kde je nejprve přítomen společně **Res** a **Teb** a později dojde k interakci těchto dvou látek a jejich aduktů s Cu navázané např. v enzymatickém komplexu (simulováno Cu elektrodou).



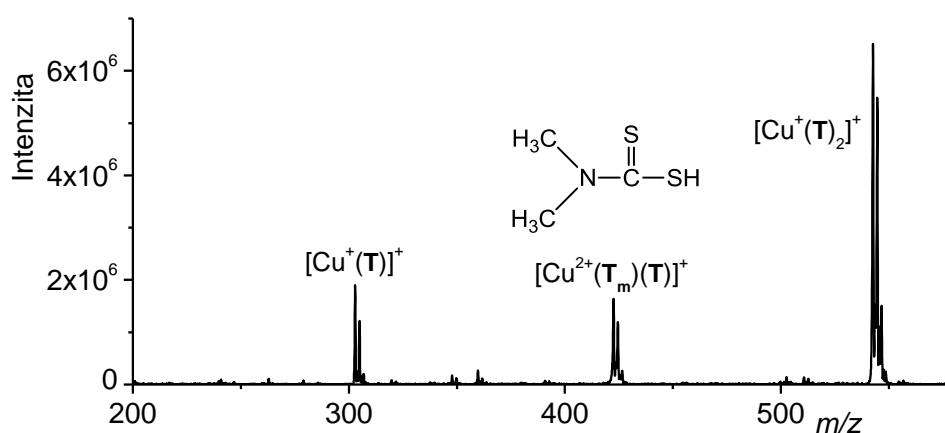
Obr. 57. Schematické znázornění pozitivního vlivu tebukonazolu (**Teb**) na tvorbu pro-oxidujících forem resveratrolu (**Res**) v přítomnosti Cu²⁺.

3.5.3 Simulování redukce thiramu

Thiram (**T**) je pesticid, který se používá pro ochranu rostlin proti okusu zejména hlodavci, ale i lesní zvěří, ale také se přidává do mastí proti kožním chorobám. Byl vybrán pro testování nejen pro jeho významné využití v zemědělství (zejména na jahody) a lesnictví, ale především pro přítomnost stericky přístupné disulfidové vazby v jeho struktuře. Dále jeho metabolismus přeměn je dobře popsán (**obr. 25**). Předpokládalo se, že bude možné studovat především rozpad disulfidové vazby, což by potom následně umožnilo tento instrumentální přístup využít např. pro studium reakcí disulfidové vazby u některých proteinů.

V elektrochemické cele byla pro případ simulování metabolismu použita jako pracovní elektroda pevná měděná elektroda. Po dobu 120 sekund byl na ní vkládán potenciál 500 mV a zároveň bylo nahráváno ESI-MS spektrum (**obr. 58**). Z hmotnostního spektra je zřejmé, že

se vytvořily především komplexy **T** s mědí, jmenovitě: $[\text{Cu}(\mathbf{T})_{1,2}]^+$; v obou případech je Cu^+ . Dále se ve spektru vyskytuje i komplex Cu^+ obsahující jeden významný metabolit **T**, ozn. \mathbf{T}_m . \mathbf{T}_m je první metabolit **T** vznikající oxidací disulfidové vazby a rozštěpením **T** na dvě symetrické molekuly \mathbf{T}_m .



Obr. 58. ESI-MS spektrum vzniklé reakcí thiramu (**T**) na měděné pracovní elektrodě, \mathbf{T}_m je první vzniklý metabolit **T**, zobrazen strukturním vzorcem.

Vznik metabolitu \mathbf{T}_m je potvrzením, že navržený instrumentální systém dokáže simulovat i rozpad (redukci) disulfidové vazby. Další metabolity přítomné na **obr. 25** vznikají totiž následnými reakcemi \mathbf{T}_m většinou za použití dalšího potřebného substrátu, jako např. alaninu nebo glukuronidu.

4 Závěr

Habilitační práce nastiňuje možnosti pochopení složitých vztahů mezi biologicky aktivními látkami na běžné fyziologické pochody spojené nejen s lidským pohybem, výkonem a vytrvalostí. To, že složení stravy ovlivňuje nejen sportovní výkon i naše zdraví, či náladu je známo. Autorka se zaměřuje především na vliv některých chemických látek, které jsou považovány jako sportovní suplementy a také na látky, které se v potravinách dnes běžně vyskytují, ale jsou považovány za nežádoucí (pesticidy a rizikové prvky).

Rešeršní část habilitace je zaměřena především na zasazení výzkumných výstupů žadatelky do širšího kontextu sportovní výživy a přítomnosti xenobiotických látek s biologickou aktivitou v potravinách i potravinových suplementech. Práce se zejména věnuje popisu účinků těchto látek na metabolismus a případné ovlivnění sportovního výkonu přes dýchací řetězec, biosyntézu sterolů (do nichž patří celá řada látek od cholesterolu, přes stresové hormony až pohlavní hormony) a přenos nervového vzruchu.

Předložená habilitační práce je koncipována jako „komentář“ k přiloženým publikacím, které jsou především zaměřené na (i) chování rizikových prvků v životním prostředí a možnostmi, jak přes kořenové membrány přecházejí do rostlin, a tak vstupují do potravního řetězce nejen člověka. Většina přiložených publikací se zabývá (ii) popisem chování pesticidů a jejich interakcemi s esenciálními prvky a také možnostmi jejich detekce v biologických matricích. Z pohledu autorky jsou nejpřínosnější publikace (včetně patentu) věnovány (iii) popisu elektrochemické cely zapojitelné před hmotnostní spektrometr a s ní související využití této instrumentace pro biomimetiku některých biochemických transformací související s rizikovým chováním vybraných látek s biologickou aktivitou.

Některé z těchto látek se využívají jako potravinové suplementy ve sportovní výživě, jiné jsou běžnou (i když nežádoucí) součástí potravin. Zvýšená pozornost je zde věnována resveratrolu (doporučovanému suplementu nejen ve sportovní výživě) a jeho ambivalentnímu (anti-oxidačnímu i pro-oxidačnímu) chování v závislosti na podmínkách prostředí. Resveratrol je zde využit jako modelový případ demonstrace funkčnosti celé metody. Jsou studovány různé interakce resveratrolu; především v přítomnosti měďnatého kationtu, v přítomnosti pesticidu tebukonazolu (pesticidu přítomného ve víně v důsledku

jeho použití zejména pro ochranu proti houbovým onemocněním révy vinné) a také v přítomnosti jak měďnatého kationtu tak tebukonazolu.

Případová studie zabývající se resveratrolem dokazuje jeho anti-oxidační vlastnosti v případě, že je v systému přítomen samostatně. Dále je doloženo reakčním mechanismem, že v přítomnosti měďnatého kationtu dochází k tvorbě produktů resveratrolu (Fentonova reakce), které mají pro-oxidační vlastnosti. Vytváří se tak sloučeniny resveratrolu s mědí, které již dříve byly popsány v literatuře a mají mnoho negativních účinků na buněčný metabolismus vedoucí až k buněčné smrti. Dokonce některé studie dokládají karcinogenní účinky těchto pro-oxidačních forem resveratrolu, které se mohou interkalovat do DNA a způsobovat tak lokální aberace.

Dále je věnována pozornost interakcím resveratrolu s tebukonazolem, významným fungicidem, který se často nachází ve víně (stejně jako přirozeně resveratrol). Tyto studie se pokouší simulovat zjednodušený „koktejlový efekt“, který by mohl nastat v případě konzumace vína. Na první pohled negativně vnímaná přítomnost tebukonazolu ve víně však může být vyvážena pozitivním zjištěním, že právě interakce tebukonazolu s resveratrolem zachovává anti-oxidační vlastnosti resveratrolu, a to i navzdory přítomnému měďnatému kationtu. Dokonce byla pozorována v *ex-situ* experimentech přítomnost produktu resveratrolu obsahujícího jak Cu^{2+} , tak tebukonazol. „Ochranný“ mechanismus tebukonazolu, zachovávající anti-oxidační vlastnosti resveratrolu, tkví především ve vazebném blokování hydroxylových skupin resveratrolu, které by jinak interagovaly s měďnatým kationtem (Fentonova reakce) a dávaly vzniknout radikálům resveratrolu, které mají jinak pro-oxidační účinky.

Závěrem chce autorka zdůraznit, že si je vědoma, že jí předložená metoda a data s její pomocí získaná jsou zatížena vysokou mírou zjednodušení. Biologický systém, organismus a životní prostředí jsou systémy neuvěřitelně komplexní (a snad právě proto krásné a vždy plné překvapení s všudy přítomným tajemstvím), přesto je možné s pomocí fyzikálně-chemických instrumentálních metod doplněných o informace získané z výpočetních metod a dalších studií získat alespoň přibližnou představu o některých zákonitostech, které v přírodě panují. Je zde nutná značná míra kritičnosti a pokory, aby nebyla získaná data chybně interpretována nebo dokonce zneužita v komerční prospěch. V budoucnu komplexnější a

systematičtější výzkum zaměřený na biomimetiku (nejen) biologicky aktivních látek využívaných ve sportovní výživě bude jistě prospěšný a pomůže zefektivnit sportovní výživu.

5 Seznam zkratek

zkratka	Význam
AE	pomocná elektroda
CID	disociace vyvolaná srážkou
EC	elektrochemická cela
ESI-MS	hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
LC	kapalinové chromatografie
MS	hmotnostní spektrometrie (detekce)
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
NCE	normalizovaná kolizní energie
PEEK	polyetherketon
RE	referentní elektroda
Res	resveratrol
T	thiram
TAG	triacylglyceroly
Teb	tebukonazol
T _m	metabolit thiramu
WE	pracovní elektroda

6 Použitá literatura

- ABOU-DONIA, M. B. Organophosphorus ester-induced chronic neurotoxicity. *Arch Environ Health*, 2003, 58(8), 484-497.
- ACWORTH, I. N. A BOWERS, M. An introduction to HPLC-based electrochemical detection: From single-electrode to multi-electrode arrays. In I.N. ACWORTH, M. NAOI, S. PARVEZ A H. PARVEZ eds. *Coulometric Electrode Array Detectors for HPLC*. Utrecht: VSP, 1997, vol. 6, p. 382.
- AL-MASRI, L. A BARTLETT, S. *100 Questions and Answers about Sports Nutrition & Exercise*. 1. vydání. Sudbury: Jones and Bartlett Publishers, 2011. 256 str. ISBN 978-0-7637-7886-6.
- ALEXANDER, D. D., MILLER, P. E., VAN ELSWYK, M. E., KURATKO, C. N., *et al.* A meta-analysis of randomized controlled trials and prospective cohort studies of eicosapentaenoic and docosahexaenoic long-chain omega-3 fatty acids and coronary heart disease risk. *Mayo Clinic Proceedings*, 2017, 92(1), 15-29.
- ANTOINE, D. J., WILLIAMS, D. P. A PARK, B. K. Understanding the role of reactive metabolites in drug-induced hepatotoxicity: state of the science. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 2008, 4(11), 1415-1427.
- ASTORINO, T. A. A ROBERSON, D. W. Efficacy of acute caffeine ingestion for short-term high-intensity exercise performance: a systematic review. *Journal of Strength and Conditioning Research*, 2010, 24(1), 257-265.
- ATSDR *Toxicological Profile for Lead*. Atlanta: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2005.
- ATWOOD, D. A PAISLEY-JONES, C. Pesticides Industry Sales and Usage 2008 - 2012 Market Estimates. Washington: U. EPA, 2017.
- AUTHORITY, E. F. S. Reasoned opinion on the modification of the existing MRLs for tebuconazole in cucumbers and courgettes. *EFSA Journal*, 2015, 13(1), 1-24.
- AZMI, A. S., BHAT, S. H. A HADI, S. M. Resveratrol–Cu(II) induced DNA breakage in human peripheral lymphocytes: Implications for anticancer properties. *FEBS letters*, 2005, 579(14), 3131-3135.
- BAILLIE, T. A. Future of toxicology-metabolic activation and drug design: Challenges and opportunities in chemical toxicology. *Chemical Research in Toxicology*, 2006, 19(7), 889-893.

- BAREK, J., FISCHER, J., NAVRÁTIL, T., PECKOVÁ, K., *et al.* Nontraditional electrode materials in environmental analysis of biologically active organic compounds. *Electroanalysis*, 2007, 19(19-20), 2003-2014.
- BASLY, J. P., MARRE-FOURNIER, F., LE BAIL, J. C., HABRIOUX, G., *et al.* Estrogenic/antiestrogenic and scavenging properties of (E)- and (Z)-resveratrol. *Life Sciences*, 2000, 66(9), 769-777.
- BAUMANN, A., LOHMANN, W., ROSE, T., AHN, K. C., *et al.* Electrochemistry-mass spectrometry unveils the formation of reactive triclocarban metabolites. *Drug Metabolism and Disposition*, 2010, 38(12), 2130-2138.
- BAUR, J. A. A SINCLAIR, D. A. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2006, 5(6), 493-506.
- BELGUENDOZ, L., FREMONT, L. A LINARD, A. Resveratrol inhibits metal ion-dependent and independent peroxidation of porcine low-density lipoproteins. *Biochemical Pharmacology*, 1997, 53(9), 1347-1355.
- BLACHE, D., RUSTAN, I., DURAND, P., LESGARDS, G., *et al.* Gas chromatographic analysis of resveratrol in plasma, lipoproteins and cells after in vitro incubations. *Journal of Chromatography B*, 1997, 702(1-2), 103-110.
- BOHÁČEK, I. *Xenobiotika. Vesmír*, 2017, 96(2), 63-63.
- BOSCH, A. N., DENNIS, S. C. A NOAKES, T. D. Influence of carbohydrate loading on fuel substrate turnover and oxidation during prolonged exercise. *Journal of Applied Physiology*, 1993, 74(4), 1921-1927.
- BRAAKHUIS, A. J. A HOPKINS, W. G. Impact of dietary antioxidants on sport performance: A review. *Sports Medicine*, 2015, 45(7), 939-955.
- BRANA, M. F., CACHO, M., GRADILLAS, A., DE PASCUAL-TERESA, B., *et al.* Intercalators as anticancer drugs. *Current Pharmaceutical Design*, 2001, 7(17), 1745-1780.
- BRANDON, E. F. A., RAAP, C. D., MEIJERMAN, I., BEIJNEN, J. H., *et al.* An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2003, 189(3), 233-246.
- BROWN, D., EDWARDS, H., SEATON, L. A BUCKLEY, T. *Lewis's Medical-Surgical Nursing: Assessment and Management of Clinical Problems*. 4. vydání. Marickville: Elsevier, 2014. 1896 str. ISBN 9780729541770.

- BRUCKENSTEIN, S. A COMEAU, J. Electrochemical mass spectrometry. Part 1.-Preliminary studies of propane oxidation on platinum. *Faraday Discussions of the Chemical Society*, 1973, 56, 285-292.
- BRUCKENSTEIN, S. A GADDE, R. R. Use of a porous electrode for in situ mass spectrometric determination of volatile electrode reaction products. *Journal of the American Chemical Society*, 1971, 93(3), 793-794.
- BRUEGGEMEIER, R. W. Update on the use of aromatase inhibitors in breast cancer. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2006, 7(14), 1919-1930.
- BRUINS, A. P. An overview of electrochemistry combined with mass spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2015, 70, 14-19.
- BUFORD, T. W., KREIDER, R. B., STOUT, J. R., GREENWOOD, M., *et al.* International Society of Sports Nutrition position stand: creatine supplementation and exercise. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 2007, 4.
- BURKE, L. *Practical Sports Nutrition*. 1. vydání. Champaign: Human Kinetics, 2007. ISBN 978-07-360-4695-X.
- BURKITT, M. J. A DUNCAN, J. Effects of trans-resveratrol on copper-dependent hydroxyl-radical formation and DNA damage: Evidence for hydroxyl-radical scavenging and a novel, glutathione-sparing mechanism of action. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2000, 381(2), 253-263.
- CAMONT, L., COTTART, C. H., RHAYEM, Y., NIVET-ANTOINE, V., *et al.* Simple spectrophotometric assessment of the trans-/cis-resveratrol ratio in aqueous solutions. *Analytica Chimica Acta*, 2009, 634(1), 121-128.
- CAMPOS-TOIMIL, M., ELIES, J., ALVAREZ, E., VERDE, I., *et al.* Effects of trans- and cis-resveratrol on Ca²⁺ handling in A7r5 vascular myocytes. *European Journal of Pharmacology*, 2007, 577(1-3), 91-99.
- CASIDA, J. E. Pest toxicology: the primary mechanisms of pesticide action. *Chemical Research in Toxicology*, 2009, 22(4), 609-619.
- CASUSO, R. A., MARTINEZ-AMAT, A., MARTINEZ-LOPEZ, E. J., CAMILETTI-MOIRON, D., *et al.* Ergogenic effects of quercetin supplementation in trained rats. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 2013, 10(3), 1-7.
- CATAK, S., D'HOOGE, M., DE KIMPE, N., WAROQUIER, M., *et al.* Intramolecular π - π stacking interactions in 2-substituted N,N-dibenzylaziridinium ions and their regioselectivity in nucleophilic ring-opening reactions. *Journal of Organic Chemistry*, 2010, 75(3), 885-896.

- CLARK, N. *Nancy Clark's Sports Nutrition Guidebook*. 5. vydání. Newton: Human Kinetics, 2014a. 520 str. ISBN 978-1-4505-5993-8.
- CLARK, N. *Sportovní výživa*. 3., dopl. vydání. Praha: Grada, 2014b. 392 str. ISBN 978-80-247-4655-5.
- CLEMENS, S., AARTS, M. G. M., THOMINE, S. A VERBRUGGEN, N. Plant science: the key to preventing slow cadmium poisoning. *Trends in Plant Science*, 2013, *18*(2), 92-99.
- COLIN, D., GIMAZANE, A., LIZARD, G., IZARD, J. C., *et al.* Effects of resveratrol analogs on cell cycle progression, cell cycle associated proteins and 5fluoro-uracil sensitivity in human derived colon cancer cells. *International Journal of Cancer*, 2009, *124*(12), 2780-2788.
- CORTA, E., BAKKALI, A., BERRUETA, L. A., GALLO, B., *et al.* Kinetics and mechanism of amitraz hydrolysis in aqueous media by HPLC and GC-MS. *Talanta*, 1999, *48*(1), 189-199.
- COULSTON, A. M. Vitamins. In *Encyclopedia of Food and Culture*. Encyclopedia.com, 2017.
- COX, J. A., TESS, M. E. A CUMMINGS, T. E. Electroanalytical methods based on modified electrodes: A review of recent advances. *Reviews in Analytical Chemistry*, 1996, *15*(3), 173-223.
- CRUMP, A. A OMURA, S. Ivermectin, 'Wonder drug' from Japan: the human use perspective. *Proceedings of the Japan Academy Series B-Physical and Biological Sciences*, 2011, *87*(2), 13-28.
- ČELEDOVÁ, L. A ČEVELA, R. *Výchova ke zdraví: vybrané kapitoly*. 1. vydání. Praha: Grada, 2010. 128 str. ISBN 978-80-247-3213-8.
- ČOLOVIĆ, M. B., KRSTIĆ, D. Z., LAZAREVIĆ-PAŠTI, T. D., BONDŽIĆ, A. M., *et al.* Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Current Neuropharmacology*, 2013, *11*(3), 315-335.
- DALVI, P. S., WILDER-KOFIE, T., MARES, B., DALVI, R. R., *et al.* Toxicologic implications of the metabolism of thiram, dimethyldithiocarbamate and carbon disulfide mediated by hepatic cytochrome P450 isozymes in rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2003, *74*(2), 85-90.
- DARIES, H. *Nutrition for Sport and Exercise*. 1. vydání. Ames: Wiley-Blackwell, 2012. 280 str. ISBN 978-1-4051-5354-6.
- DE QUADROS, L., BRANDAO, I. A LONGHI, R. Ascorbic acid and performance: A review. *Vitamins & Minerals*, 2016, *5*(1), 136/131-136/134.
- DELMAS, D., AIRES, V., LIMAGNE, E., DUTARTRE, P., *et al.* Transport, stability, and biological activity of resveratrol. In O. VANG A D.K. DAS eds. *Resveratrol and Health*. Malden: Wiley-Blackwell, 2011, vol. 1215, p. 48-59.

- DELMAS, D., JANNIN, B., CHERKAOUI-MALKI, M. A LATRUFFE, N. Inhibitory effect of resveratrol on the proliferation of human and rat hepatic derived cell lines. *Oncology Reports*, 2000, 7(4), 847-852.
- DELMAS, D., JANNIN, B. A LATRUFFE, N. Resveratrol: Preventing properties against vascular alterations and ageing. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2005, 49(5), 377-395.
- DELMAS, D., LANCON, A., COLIN, D., JANNIN, B., *et al.* Resveratrol as a chemopreventive agent: A promising molecule for fighting cancer. *Current Drug Targets*, 2006, 7(4), 423-442.
- DENG, H. T. A VAN BERKEL, G. J. Electrochemical polymerization of aniline investigated using on line electrochemistry/electrospray mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 1999a, 71(19), 4284-4293.
- DENG, H. T. A VAN BERKEL, G. J. A thin-layer electrochemical flow cell coupled on-line with electrospray-mass spectrometry for the study of biological redox reactions. *Electroanalysis*, 1999b, 11(12), 857-865.
- DLOUHÁ, R. *Výživa: přehled základní problematiky*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 1998. 215 str. ISBN 80-7184-757-7.
- DUNATCHIK, A. P., ITO, M. K. A DUJOVNE, C. A. A systematic review on evidence of the effectiveness and safety of a wax-matrix niacin formulation. *Journal of Clinical Lipidology*, 2012, 6(2), 121-131.
- ECONOMOU, A. Recent developments in on-line electrochemical stripping analysis—An overview of the last 12 years. *Analytica Chimica Acta*, 2010, 683(1), 38-51.
- EFSA Scientific opinion on risk assessment for a selected group of pesticides from the triazole group to test possible methodologies to assess cumulative effects from exposure through food from these pesticides on human health. *EFSA Journal*, 2009, 7(9), 1167.
- EFSA Scientific opinion on the relevance of dissimilar mode of action and its appropriate application for cumulative risk assessment of pesticides residues in food. *EFSA Journal*, 2013, 11(12), 3472.
- ELSAYED, M. S., RATTU, A. J. M. A ROBERTS, I. Effects of carbohydrate feeding before and during prolonged exercise on subsequent maximal exercise performance capacity. *International Journal of Sport Nutrition*, 1995, 5(3), 215-224.
- ELSTNER, M., HOBZA, P., FRAUENHEIM, T., SUHAI, S., *et al.* Hydrogen bonding and stacking interactions of nucleic acid base pairs: A density-functional-theory based treatment. *Journal of Chemical Physics*, 2001, 114(12), 5149-5155.

- EU. Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products. In., 2009.
- FABER, H., VOGEL, M. A KARST, U. Electrochemistry/mass spectrometry as a tool in metabolism studies-A review. *Analytica Chimica Acta*, 2014, *834*, 9-21.
- FAROON, O., ASHIZAWA, A., WRIGHT, S., TUCKER, P., *et al.* *Toxicological Profile for Cadmium*. Atlanta: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2012.
- FELIG, P. A WAHREN, J. Fuel homeostasis in exercise. *New England Journal of Medicine*, 1975, *293*(21), 1078-1084.
- FORMAN, J. P., SCOTT, J. B., NG, K., DRAKE, B. F., *et al.* Effect of vitamin D supplementation on blood pressure in blacks. *Hypertension*, 2013, *61*(4), 779-785.
- FOŘT, P. *Sport a správná výživa*. 1. vydání. Praha: Ikar, 2002. 351 str. ISBN 80-249-0124-2.
- FOŘT, P. *Výživa pro dokonalou kondici a zdraví*. 1. vydání. Praha: Grada, 2004. 181 str. ISBN 80-247-1057-9.
- FOSTER, C., COSTILL, D. L. A FINK, W. J. Gastric emptying characteristics of glucose and glucose polymer solutions. *Research Quarterly for Exercise and Sport*, 1980, *51*(2), 299-305.
- FRAKER, P. J. A KING, L. E. Reprogramming of the immune system during zinc deficiency. *Annual Review of Nutrition*, 2004, *24*, 277-298.
- FRANKEL, E. N., WATERHOUSE, A. L. A KINSELLA, J. E. Letters to the editor: Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *The Lancet*, 1993, *341*(8852), 1103-1104.
- FREDERICKSON, C. J., KOH, J. Y. A BUSH, A. I. The neurobiology of zinc in health and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 2005, *6*(6), 449-462.
- FREDHOLM, B. B., BATTIG, K., HOLMEN, J., NEHLIG, A., *et al.* Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacological Reviews*, 1999, *51*(1), 83-133.
- FUKUHARA, K. A MIYATA, N. Resveratrol as a new type of DNA-cleaving agent. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1998, *8*(22), 3187-3192.
- FUKUHARA, K., NAGAKAWA, M., NAKANISHI, I., OHKUBO, K., *et al.* Structural basis for DNA-cleaving activity of resveratrol in the presence of Cu(II). *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2006, *14*(5), 1437-1443.

- GANIO, M. S., KLAU, J. F., CASA, D. J., ARMSTRONG, L. E., *et al.* Effect of caffeine on sport-specific endurance performance: a systematic review. *Journal of Strength and Conditioning Research*, 2009, 23(1), 315-324.
- GARBELLINI, G. S., ULIANA, C. V. A YAMANAKA, H. Interaction of organophosphorus pesticides with DNA nucleotides on a boron-doped diamond electrode. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2013, 24(12), 1942-1949.
- GEORGOPAPADAKOU, N. H. Antifungals: mechanism of action and resistance, established and novel drugs. *Current Opinion in Microbiology*, 1998, 1(5), 547-557.
- GERVASIO, F. L., PROCACCI, P., CARDINI, G., GUARNA, A., *et al.* Interaction between aromatic residues. Molecular dynamics and *ab initio* exploration of the potential energy surface of the tryptophan-histidine pair. *Journal of Physical Chemistry B*, 2000, 104(5), 1108-1114.
- GISOLFI, C. V., SUMMERS, R. W., SCHEDL, H. P. A BLEILER, T. L. Intestinal water absorption from select carbohydrate solutions in humans. *Journal of Applied Physiology*, 1992, 73(5), 2142-2150.
- GOLUB, M. S., KEEN, C. L., GERSHWIN, M. E. A HENDRICKX, A. G. Developmental zinc deficiency and behavior. *Journal of Nutrition*, 1995, 125(8), S2263-S2271.
- GOMEZ-CABRERA, M.-C., DOMENECH, E., ROMAGNOLI, M., ARDUINI, A., *et al.* Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in endurance performance. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2008, 87(1), 142-149.
- GUEZENNEC, C. Y. Oxidation rates, complex carbohydrates and exercise. Practical recommendations. *Sports Medicine*, 1995, 19(6), 365-372.
- GUEZENNEC, C. Y., SATABIN, P., DUFOREZ, F., KOZIET, J., *et al.* The role of type and structure of complex carbohydrates response to physical exercise. *International Journal of Sports Medicine*, 1993, 14(4), 224-231.
- GUN, J., BHARATHI, S., GUTKIN, V., RIZKOV, D., *et al.* Highlights in coupled electrochemical flow cell-mass spectrometry, EC/MS. *Israel Journal of Chemistry*, 2010, 50(3), 360-373.
- GUNASINGHAM, H. A FLEET, B. Wall-jet electrode in continuous monitoring voltammetry. *Analytical Chemistry*, 1983, 55(8), 1409-1414.
- HAJŠLOVÁ, J. Ěčka jsou jen byznys. Nutriční terapeuti je démonizují, říká profesorka. In L. ČERNOHLÁVEK. *TÉMA. TÉMA*, 2015.
- HAJŠLOVÁ, J. A BOBŮRKOVÁ, E. Jedy a mýty (rozhovor). *Vesmír*, 2017, 96(2), 88-89.

- HARRIS, R. C., SODERLUND, K. A HULTMAN, E. Elevation of creatine in resting and exercised muscle of normal subjects by creatine supplementation. *Clinical Science*, 1992, 83(3), 367-374.
- HART, N., SARGA, L., CSENDE, Z., KOCH, L. G., *et al.* Resveratrol attenuates exercise-induced adaptive responses in rats selectively bred for low running performance. *Dose Response*, 2014, 12(1), 57-71.
- HASS, U., BOBERG, J., CHRISTIANSEN, S., JACOBSEN, P. R., *et al.* Adverse effects on sexual development in rat offspring after low dose exposure to a mixture of endocrine disrupting pesticides. *Reproductive Toxicology*, 2012, 34(2), 261-274.
- HAVLÍČKOVÁ, L. *Biologie dítěte: rané fáze lidské ontogenéze*. Praha: Karolinum, 1998. 93 str. ISBN 80-7184-644-9.
- HERRMANN, M., OBEID, R., SCHARHAG, J., KINDERMANN, W., *et al.* Altered vitamin B-12 status in recreational endurance athletes. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 2005, 15(4), 433-441.
- HILL, A. M., WORTHLEY, C., MURPHY, K. J., BUCKLEY, J. D., *et al.* n-3 Fatty acid supplementation and regular moderate exercise: differential effects of a combined intervention on neutrophil function. *British Journal of Nutrition*, 2007, 98(2), 300-309.
- HOFFMANGOETZ, L. A PEDERSEN, B. K. Exercise and the immune system: a model of the stress response. *Immunology Today*, 1994, 15(8), 382-387.
- HOLLOWAY, L. N., PANNELL, K. H. A WHALEN, M. M. Effects of a series of triorganotins on ATP levels in human natural killer cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2008, 25(1), 43-50.
- CHAUDHRY, M. Q. A review of the mechanisms involved in the action of phosphine as an insecticide and phosphine resistance in stored-product insects. *Pesticide Science*, 1997, 49(3), 213-228.
- CHEN, X. J., HE, H., WANG, G. J., YANG, B., *et al.* Stereospecific determination of *cis*- and *trans*-resveratrol in rat plasma by HPLC: application to pharmacokinetic studies. *Biomedical Chromatography*, 2007, 21(3), 257-265.
- CHOI, S.-K., BAEK, S.-H. A CHOI, S.-W. The effects of endurance training and thiamine supplementation on anti-fatigue during exercise. *Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry*, 2013, 17(4), 189-198.
- JAHNERT, T., HAGER, M. D. A SCHUBERT, U. S. Application of phenolic radicals for antioxidants, as active materials in batteries, magnetic materials and ligands for metal-complexes. *Journal of Materials Chemistry A*, 2014, 2(37), 15234-15251.

- JAKL, M., FANFRLÍK, J. A JAKLOVÁ DYTRTOVÁ, J. Mimicking of cyproconazole behavior in the Cu and Zn presence. *Journal of Pest Science*, 2017, *submitted*.
- JAKLOVÁ DYTRTOVÁ, J., FANFRLÍK, J., NORKOVÁ, R., JAKL, M., *et al.* Theoretical insight into the stabilization of triazole fungicides via their interactions with dications. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2014, *359(0)*, 38-43.
- JAKLOVÁ DYTRTOVÁ, J. A JAKL, M. Hyphenation of electrochemical methods with mass spectrometry - The potential for analytical and physical chemistry and biochemistry. *Chemicke Listy*, 2016a, *110(1)*, 31-39.
- JAKLOVÁ DYTRTOVÁ, J. A JAKL, M. 2016b. Mimicking of thiram metabolism using electrochemistry hyphenated with mass spectrometry. In *Proceedings of the Modern Electrochemical Methods XXXVI*, Jetřichovice, Czech Republic, 23-27 May 2016 2016b, T. NAVRÁTIL, M. FOJTA A K. SCHWARZOVÁ eds. Lenka Srsenová - BEST Servis, Ústí nad Labem, 91-94.
- JAKLOVÁ DYTRTOVÁ, J., JAKL, M., KOLIHOVÁ, D., MIHOLOVÁ, D., *et al.* The effect of low-molecular-weight organic acids on cadmium assay using diffusive gradient in thin film technique. *Chemicke Listy*, 2009a, *103(5)*, 401-406.
- Průtočné elektrochemické zařízení. JAKLOVÁ DYTRTOVÁ, J., JAKL, M., NAVRÁTIL, T. A CVAČKA, J. B6 number CZ 305 266:
- JAKLOVÁ DYTRTOVÁ, J., JAKL, M., NAVRÁTIL, T., CVAČKA, J., *et al.* An electrochemical device generating metal ion adducts of organic compounds for electrospray mass spectrometry. *Electrochimica Acta*, 2016a, *211*, 787-793.
- JAKLOVÁ DYTRTOVÁ, J., JAKL, M., NORKOVÁ, R. A NAVRÁTIL, T. Optimization of a flow rate for a hyphenation of voltammetry with electrospray ionization mass spectrometry. In T. NAVRÁTIL A M. FOJTA. *Modern Electrochemical Methods XXXII*. Jetřichovice: Best Servis, Ústí nad Labem, 2012a, p. 54-57.
- JAKLOVÁ DYTRTOVÁ, J., JAKL, M. A PETR, M. Malý velký oxid. *Vesmír*, 2016b, *95(9)*, 498-499.
- JAKLOVÁ DYTRTOVÁ, J., JAKL, M. A SCHRÖDER, D. Complexation of malic acid with cadmium(II) probed by electrospray ionization mass spectrometry. *Talanta*, 2012b, *90C*, 63-68.
- JAKLOVÁ DYTRTOVÁ, J., JAKL, M., SCHRÖDER, D., ČADKOVÁ, E., *et al.* Complexation between the fungicide tebuconazole and copper(II) probed by electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2011a, *25*, 1037-1042.

- JAKLOVÁ DYTRTOVÁ, J., JAKL, M., SCHRÖDER, D. A NAVRÁTIL, T. Electrochemical and spectrometric detection of low-molecular-weight organic acids and their complexes with metals. *Current Organic Chemistry*, 2011b, 15(17), 2970-2982.
- JAKLOVÁ DYTRTOVÁ, J., JAKL, M., SCHRÖDER, D. A NORKOVÁ, R. In situ generation of copper cations and complexation with tebuconazole in a hyphenation of electrochemistry with mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2013, 338, 45-49.
- JAKLOVÁ DYTRTOVÁ, J., JAKL, M., ŠESTÁKOVÁ, I., ZINS, E.-L., *et al.* A new approach to study cadmium complexes with oxalic acid in soil solution. *Analytica Chimica Acta*, 2011c, 693(1-2), 100-105.
- JAKLOVÁ DYTRTOVÁ, J., ŠESTÁKOVÁ, I., JAKL, M. A NAVRÁTIL, T. Electrochemical detection of cadmium and lead complexes with low molecular weight organic acids. *Electroanalysis*, 2009b, 21(3-5), 573-579.
- JAKLOVÁ DYTRTOVÁ, J., ŠESTÁKOVÁ, I., JAKL, M., SZÁKOVÁ, J., *et al.* The use of differential pulse anodic stripping voltammetry and diffusive gradient in thin films for heavy metals speciation in soil solution. *Central European Journal of Chemistry*, 2008, 6(1), 71-79.
- JANNIN, B., MENZEL, M., BERLOT, J. P., DELMAS, D., *et al.* Transport of resveratrol, a cancer chemopreventive agent, to cellular targets: plasmatic protein binding and cell uptake. *Biochemical Pharmacology*, 2004, 68(6), 1113-1118.
- JAYASINGHE, C., GOTOH, N. A WADA, S. Pro-oxidant/antioxidant behaviours of ascorbic acid, tocopherol, and plant extracts in n-3 highly unsaturated fatty acid rich oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 2013, 141(3), 3077-3084.
- JENKINS, D. J. A., WOLEVER, T. M. S., TAYLOR, R. H., BARKER, H., *et al.* Glycemic index of foods: A physiological basis for carbohydrate exchange. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1981, 34(3), 362-366.
- JIN, Z., DAIYA, S. A KENTTAMAA, H. I. Characterization of nonpolar lipids and selected steroids by using laser-induced acoustic desorption/chemical ionization, atmospheric pressure chemical ionization, and electrospray ionization mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2011, 301(1-3), 234-239.
- JUHN, M. S. A TARNOPOLSKY, M. Potential side effects of oral creatine supplementation: A critical review. *Clinical Journal of Sport Medicine*, 1998, 8(4), 298-304.
- KAFKA, Z. A PUNČOCHÁŘOVÁ, J. Těžké kovy v přírodě a jejich toxicita. *Chemicke Listy*, 2002, 96(7), 611-617.

- KENNEDY, M. C., GLASS, C. R., BOKKERS, B., HART, A. D. M., *et al.* A European model and case studies for aggregate exposure assessment of pesticides. *Food and Chemical Toxicology*, 2015, 79, 32-44.
- KIM, K. H., KABIR, E. A. JAHAN, S. A. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Science of The Total Environment*, 2017, 575, 525-535.
- KIMBALL, S., VIETH, R., DOSCH, H. M., BAR-OR, A., *et al.* Cholecalciferol plus calcium suppresses abnormal PBMC reactivity in patients with multiple sclerosis. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2011, 96(9), 2826-2834.
- KONÁŠOVÁ, R., JAKLOVÁ DYTRTOVÁ, J. A KAŠIČKA, V. Determination of acid dissociation constants of triazole fungicides by pressure assisted capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 2015, 1408, 243-249.
- KONOPKA, P. *Sportovní výživa*. České Budějovice: Kopp, 2004. 125 str. ISBN 80-7232-228-1.
- KORTENKAMP, A. Low dose mixture effects of endocrine disrupters and their implications for regulatory thresholds in chemical risk assessment. *Current Opinion in Pharmacology*, 2014, 19, 105-111.
- KOVACIC, G.-R., LESNIK, M. A VRSIC, S. An overview of the copper situation and usage in viticulture. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 2013, 19(1), 50-59.
- KREIDER, R. B., WILBORN, C. D., TAYLOR, L., CAMPBELL, B., *et al.* ISSN exercise & sport nutrition review: research & recommendations. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 2010, 7, 7/1-7/43.
- KRIS-ETHERTON, P. M., HARRIS, W. S., APPEL, L. J. A NUTRITION, C. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation*, 2002, 106(21), 2747-2757.
- LANGCAKE, P. A PRYCE, R. J. A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia*, 1977, 33(2), 151-152.
- LAZA-KNOERR, A. L., GREF, R. A COUVREUR, P. Cyclodextrins for drug delivery. *Journal of Drug Targeting*, 2010, 18(9), 645-656.
- LEE, E. C., KIM, D., JURECKA, P., TARAKESHWAR, P., *et al.* Understanding of assembly phenomena by aromatic-aromatic interactions: Benzene dimer and the substituted systems. *Journal of Physical Chemistry A*, 2007, 111(18), 3446-3457.
- LEESE, G. P., BOWTELL, J., MUDAMBO, S., REYNOLDS, N., *et al.* Post-exercise gastric emptying of carbohydrate solutions determined using the ¹³C acetate breath test. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, 1995, 71(4), 306-310.

- LOHMANN, W. A KARST, U. Generation and identification of reactive metabolites by electrochemistry and immobilized enzymes coupled on-line to liquid chromatography/mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(17), 6831-6839.
- LOPEZ-NICOLAS, J. M. A GARCIA-CARMONA, F. Aggregation state and pK(a) values of (E)-resveratrol as determined by fluorescence spectroscopy and UV-visible absorption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(17), 7600-7605.
- LOPEZ-NICOLAS, J. M., NUNEZ-DELICADO, E., PEREZ-LOPEZ, A. J., BARRACHINA, A. C., *et al.* Determination of stoichiometric coefficients and apparent formation constants for beta-cyclodextrin complexes of trans-resveratrol using reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1135(2), 158-165.
- MACLAREN, D., MILES, A., ONEILL, I., CRITCHLEY, M., *et al.* Use of radionuclide imaging to determine gastric emptying of carbohydrate solutions during exercise. *British Journal of Sports Medicine*, 1996, 30(1), 20-23.
- MACLAREN, D. P. M., REILLY, T., CAMPBELL, I. T. A FRAYN, K. N. Hormonal and metabolite responses to glucose and maltodextrin ingestion with or without the addition of guar gum. *International Journal of Sports Medicine*, 1994, 15(8), 466-471.
- MACHA, S. F., LIMBACH, P. A., HANTON, S. D. A OWENS, K. G. Silver cluster interferences in matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry of nonpolar polymers. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2001, 12(6), 732-743.
- MAKRLÍK, E., JAKLOVÁ DYTRTOVÁ, J., VAŇURA, P., SÝKORA, J., *et al.* Cation- π interaction of Ag⁺ with [6]helicene: An experimental and theoretical study. *Chemical Physics Letters*, 2015, 633, 105-108.
- MANDELOVÁ, L. A HRNČIŘÍKOVÁ, I. *Základy výživy ve sportu*. 1. vydání. Brno: Masarykova univerzita, 2007. 71 str. ISBN 978-802-1042-810.
- MANORE, M. M. Effect of physical activity on thiamine, riboflavin, and vitamin B-6 requirements. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2000, 72(2), 598S-606S.
- MAREL, A. K., LIZARD, G., IZARD, J. C., LATRUFFE, N., *et al.* Inhibitory effects of trans-resveratrol analogs molecules on the proliferation and the cell cycle progression of human colon tumoral cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2008, 52(5), 538-548.
- MARET, W. A SANDSTEAD, H. H. Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2006, 20(1), 3-18.

- MAUGHAN, R. J. A BURKE, L. Výživa ve sportu: příručka pro sportovní medicínu. In. Praha: Galén, 2006, p. 311.
- MAVERAKIS, E., FUNG, M. A., LYNCH, P. J., DRAZNIN, M., *et al.* Acrodermatitis enteropathica and an overview of zinc metabolism. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2007, 56(1), 116-124.
- MAZUE, F., COLIN, D., GOBBO, J., WEGNER, M., *et al.* Structural determinants of resveratrol for cell proliferation inhibition potency: Experimental and docking studies of new analogs. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2010, 45(7), 2972-2980.
- MCCREERY, R. L. Advanced carbon electrode materials for molecular electrochemistry. *Chemical Reviews*, 2008, 108(7), 2646-2687.
- MCLAUGHLIN, M. J., ZARCINAS, B. A., STEVENS, D. P. A COOK, N. Soil testing for heavy metals. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 2000, 31(11-14), 1661-1700.
- MCNAMARA, R. K. Role of Omega-3 fatty acids in the etiology, treatment, and prevention of depression: Current status and future directions. *Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism*, 2016, 5, 96-106.
- MELLES, D., VIELHABER, T., BAUMANN, A., ZAZZERONI, R., *et al.* *In chemico* evaluation of skin metabolism: Investigation of eugenol and isoeugenol by electrochemistry coupled to liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2013, 913-914, 106-112.
- MEYER, U. A. Overview of enzymes of drug metabolism. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, 1996, 24(5), 449-459.
- MIKULSKI, D., EDER, K. A MOLSKI, M. Quantum-chemical study on stacking interactions between bioactive polyphenols (trans-resveratrol, trans-piceatannol) and ribonucleosides. Insight into minimum energy geometries of π - π stacked systems. *Computational and Theoretical Chemistry*, 2014, 1046, 118-125.
- MIKULSKI, D. A MOLSKI, M. Quantum chemistry study of interaction of Cu^{2+} cation and aqua-copper $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_{1-4}]^{2+}$ complexes with resveratrol stereoisomers, phospholipid and deoxythymidine 5'-monophosphate. *Journal of Molecular Structure-Theochem*, 2010, 956(1-3), 66-76.
- MISRA, K. B. Vitamins, Water-Soluble. In *Nutrition and Well-Being A to Z*. Encyclopedia.com, 2017.

- MOHAPATRA, S., AHUJA, A. K., DEEPA, M., JAGADISH, G. K., *et al.* Behaviour of trifloxystrobin and tebuconazole on grapes under semi-arid tropical climatic conditions. *Pest Management Science*, 2010, 66(8), 910-915.
- MOODLEY, D., NOAKES, T. D., BOSCH, A. N., HAWLEY, J. A., *et al.* Oxidation of exogenous carbohydrate during prolonged exercise: the effects of the carbohydrate type and its concentration. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, 1992, 64(4), 328-334.
- MORI, T. A. A BEILIN, L. J. Omega-3 fatty acids and inflammation. *Current Atherosclerosis Reports*, 2004, 6(6), 461-467.
- MURRAY, R. Role of anti-aromatase agents in postmenopausal advanced breast cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2001, 48(4), 259-265.
- MURRAY, R., EDDY, D. E., BARTOLI, W. P. A PAUL, G. L. Gastric emptying of water and isocaloric carbohydrate solutions consumed at rest. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 1994, 26(6), 725-732.
- MURRAY, R., PAUL, G. L., SEIFERT, J. G., EDDY, D. E., *et al.* The effects of glucose, fructose, and sucrose ingestion during exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 1989, 21(3), 275-282.
- NARAHASHI, T. Nerve membrane Na⁺ channels as targets of insecticides. *Trends in Pharmacological Sciences*, 1992, 13(6), 236-241.
- NAVRÁTIL, T. A BAREK, J. Analytical applications of composite solid electrodes. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2009, 39(3), 131-147.
- NEHLIG, A. Are we dependent upon coffee and caffeine? A review on human and animal data. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 1999, 23(4), 563-576.
- NEHLIG, A. A DEBRY, G. Caffeine and sports activity - a review. *International Journal of Sports Medicine*, 1994, 15(5), 215-223.
- NESNOW, S., WARD, W., MOORE, T., REN, H. Z., *et al.* Discrimination of tumorigenic triazole conazoles from phenobarbital by transcriptional analyses of mouse liver gene expression. *Toxicological Sciences*, 2009, 110(1), 68-83.
- NEUMANN, G. *Nutrition in sport*. 1. vydání. Oxford: Meyer & Meyer Sport, 2001. 207 str. ISBN 1-84126-003-7.

- NEUMANN, G., PFÜTZNER, A. A HOTTENROTT, K. *Trénink pod kontrolou: metody, kontrola a vyhodnocení vytrvalostního tréninku*. 1. vydání. Praha: Grada, 2005. 184 str. ISBN 80-247-0947-3.
- NIKOLAIDIS, M. G., KERKSICK, C. M., LAMPRECHT, M. A MCANULTY, S. R. Does vitamin C and E supplementation impair the favorable adaptations of regular exercise? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 2012, 707941.
- NISSEN, S., SHARP, R., RAY, M., RATHMACHER, J. A., *et al.* Effect of leucine metabolite beta-hydroxy-beta-methylbutyrate on muscle metabolism during resistance-exercise training. *Journal of Applied Physiology*, 1996, 81(5), 2095-2104.
- NOVÁKOVÁ, K., NAVRÁTIL, T., JAKLOVÁ DYTRTOVÁ, J. A CHÝLKOVÁ, J. The use of copper solid amalgam electrodes for determination of the pesticide thiram. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 2013, 17(6), 1517-1528.
- NOVOTNÁ, V., ČECHOVSKÁ, I. A BUNC, V. *Fit programy pro ženy*. 1. vydání. Praha: Grada, 2006. 223 str. ISBN 80-247-1191-5.
- NURMINEN, M. L., NIITTYNEN, L., KORPELA, R. A VAPAATALO, H. Coffee, caffeine and blood pressure: a critical review. *European Journal of Clinical Nutrition*, 1999, 53(11), 831-839.
- ORALLO, F. Comparative studies of the antioxidant effects of cis- and trans-resveratrol. *Current Medicinal Chemistry*, 2006, 13(1), 87-98.
- OSTEN, P. *Osobní trenér III*. 1. vydání. Praha: Grada, 2005. ISBN 80-247-1133-8.
- PALATINI, P., CANALI, C., GRANIERO, G. R., ROSSI, G., *et al.* Relationship of plasma renin activity with caffeine intake and physical training in mild hypertensive men. *European Journal of Epidemiology*, 1996, 12(5), 485-491.
- PARK, B. K., KITTERINGHAM, N. R., MAGGS, J. L., PIRMOHAMED, M., *et al.* The role of metabolic activation in drug-induced hepatotoxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2005, 45, 177-202.
- PEFFER, R. C., MOGGS, J. G., PASTOOR, T., CURRIE, R. A., *et al.* Mouse liver effects of cyproconazole, a triazole fungicide: Role of the constitutive androstane receptor. *Toxicological Sciences*, 2007, 99(1), 315-325.
- PELCHOVITZ, D. J. A GOLDBERGER, J. J. Caffeine and cardiac arrhythmias: a review of the evidence. *American Journal of Medicine*, 2011, 124(4), 284-289.

- PELKONEN, O., TURPEINEN, M., UUSITALO, J., RAUTIO, A., *et al.* Prediction of drug metabolism and interactions on the basis of in vitro investigations. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2005, *96*(3), 167-175.
- PERONNET, F., MASSICOTTE, D., BRISSON, G. A HILLAIRE-MARCEL, C. Use of ¹³C substrates for metabolic studies in exercise: methodological considerations. *Journal of Applied Physiology*, 1990, *69*(3), 1047-1052.
- PLATTNER, S., ERB, R., PITTERL, F., BROUWER, H. J., *et al.* Formation and characterization of covalent guanosine adducts with electrochemistry-liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2012, *883-884*, 198-204.
- PODSTATOVÁ, H. *Základy epidemiologie a hygieny*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 2009. 158 str. ISBN 978-80-246-1631-5.
- PRIETO GARCIA, F., CORTÉS ASCENCIO, S. Y., GAYTAN OYARZUN, J. C., CERUELO HERNANDEZ, A., *et al.* Pesticides: classification, uses and toxicity. Measures of exposure and genotoxic risks. *Journal of Research in Environmental Science and Toxicology*, 2012, *1*(11), 279-293.
- PROVAZNÍK, K. *Manuál prevence v lékařské praxi: Díl 1-5, souborné vydání*. 1. vydání. Praha: Fortuna, Státní zdravotní ústav, 1998. 622 str. ISBN 80-7071-080-2.
- RAGHAVENDRA, K., BARIK, T. K., SHARMA, P., BHATT, R. M., *et al.* Chlorfenapyr: a new insecticide with novel mode of action can control pyrethroid resistant malaria vectors. *Malaria Journal*, 2011, *10*(16), 1-7.
- RAUCY, J. L., CARPENTER, S. J. A TRZASKOS, J. M. Identification of lanosterol 14 α -methyl demethylase in human tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1991, *177*(1), 497-503.
- RHOMBERG, L. R. A GOODMAN, J. E. Low-dose effects and nonmonotonic dose-responses of endocrine disrupting chemicals: Has the case been made? *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2012, *64*(1), 130-133.
- RHUE, R. D., MANSELL, R. S., OU, L. T., COX, R., *et al.* The fate and behavior of lead alkyls in the environment: a review. *Critical Reviews in Environmental Control*, 1992, *22*(3-4), 169-193.
- RIEKE, S., KOEHN, S., HIRSCH-ERNST, K., PFEIL, R., *et al.* Combination effects of (tri)azole fungicides on hormone production and xenobiotic metabolism in a human placental cell line. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2014, *11*(9), 9661-9680.

- RISTOW, M., ZARSE, K., OBERBACH, A., KLOTING, N., *et al.* Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, *106*(21), 8665-8670.
- ROBERTS, T. R. A HUTSON, D. H. *Metabolic Pathways of Agrochemicals: Part 2: Insecticides and Fungicides*. In. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1999, p. 1475.
- ROMERO-PEREZ, A. I., IBERN-GOMEZ, M., LAMUELA-RAVENTOS, R. M. A DE LA TORRE-BORONAT, M. C. Piceid, the major resveratrol derivative in grape juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, *47*(4), 1533-1536.
- SAKAI, T. Biomarkers of lead exposure. *Industrial Health*, 2000, *38*(2), 127-142.
- SAMEC, Z. Dynamic electrochemistry at the interface between two immiscible electrolytes. *Electrochimica Acta*, 2012, *84*, 21-28.
- SANTNER, S. J., PAULEY, R. J., TAIT, L., KASETA, J., *et al.* Aromatase activity and expression in breast cancer and benign breast tissue stromal cells. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1997, *82*(1), 200-208.
- SEIWERT, B., HENNEKEN, H. A KARST, U. Ferrocenoyl piperazide as derivatizing agent for the analysis of isocyanates and related compounds using liquid chromatography/electrochemistry/mass spectrometry (LC/EC/MS). *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2004, *15*(12), 1727-1736.
- SENDA, M., KAKIUCHI, T. A OSAKAI, T. Electrochemistry at the interface between two immiscible electrolyte solutions. *Electrochimica Acta*, 1991, *36*(2), 253-262.
- SHERRILL, C. D. Energy component analysis of pi interactions. *Accounts of Chemical Research*, 2013, *46*(4), 1020-1028.
- SHONO, T., OHMIZU, Y., TODA, T. A OSHINO, N. Regioselectivity and reactivity in microsomal hydroxylation of a series of N-acyl- and N-sulfonylamines in rats. *Drug Metabolism and Disposition*, 1981, *9*(5), 476-480.
- SCHEIBER, I., DRINGEN, R. A MERCER, J. F. B. Copper: Effects of Deficiency and Overload. In A. SIGEL, H. SIGEL A R.K.O. SIGEL eds. *Interrelations between Essential Metal Ions and Human Diseases*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2013, p. 359-387.
- SCHMIDT, F., MARX-STOELTING, P., HAIDER, W., HEISE, T., *et al.* Combination effects of azole fungicides in male rats in a broad dose range. *Toxicology*, 2016, *355*, 54-63.

- SCHULER, F. A CASIDA, J. E. The insecticide target in the PSST subunit of complex I. *Pest Management Science*, 2001, 57(10), 932-940.
- SINCLAIR, C. J. D. A GEIGER, J. D. Caffeine use in sports - A pharmacological review. *Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*, 2000, 40(1), 71-79.
- SKOLNIK, H. A CHERNUS, A. *Výživa pro maximální sportovní výkon - správně načasovaný jídelníček*. 1. vydání. Praha: Grada, 2011. 240 str. ISBN 978-80-247-3847-5.
- SOGORB, M. A. A VILANOVA, E. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicology Letters*, 2002, 128(1-3), 215-228.
- SOLOMON, L. R. Functional cobalamin (vitamin B₁₂) deficiency: role of advanced age and disorders associated with increased oxidative stress. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2015, 69(6), 687-692.
- STANHOPE, R. Use of a specific aromatase inhibitor in delayed puberty. *The Lancet*, 2001, 357(9270), 1723-1724.
- STEENGE, G. R., LAMBOURNE, J., CASEY, A., MACDONALD, I. A., *et al.* Stimulatory effect of insulin on creatine accumulation in human skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 1998, 275(6), E974-E979.
- STRESSER, D. M., CRESPI, C. L. A PATTEN, C. Cytochrome P450 enzyme mapping in drug discovery using Corning® Supersomes™ Enzymes. Application Note 467. In. Tewksbury: Corning, 2013, p. 1-8.
- STRÖMSTEDT, M., ROZMAN, D. A WATERMAN, M. R. The ubiquitously expressed human CYP51 encodes lanosterol 14 alpha-demethylase, a cytochrome P450 whose expression is regulated by oxysterols. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1996, 329(1), 73-81.
- SWANSON, R. A. A GRAHAM, S. H. Fluorocitrate and fluoroacetate effects on astrocyte metabolism *in vitro*. *Brain Research*, 1994, 664(1-2), 94-100.
- TAKAYA, Y., TERASHIMA, K., ITO, J., HE, Y. H., *et al.* Biomimic transformation of resveratrol. *Tetrahedron*, 2005, 61(43), 10285-10290.
- TALAEI, A., MOHAMADI, M. A ADGI, Z. The effect of vitamin D on insulin resistance in patients with type 2 diabetes. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 2013, 5, 8/1-8/5.
- TAMBOLI, V., DEFANT, A., MANCINI, I. A TOSI, P. A study of resveratrol-copper complexes by electrospray ionization mass spectrometry and density functional theory calculations. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2011, 25(4), 526-532.

- TARNOPOLSKY, M. A. Caffeine and creatine use in sport. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 2010, 57(Suppl. 2), 1-8.
- TINTARU, A., CHARLES, L., MILKO, P., ROITHOVÁ, J., *et al.* Redox reactions of copper(II) upon electrospray ionization in the presence of acridine ligands with an amide side chain. *Journal of Physical Organic Chemistry*, 2009, 22(3), 229-233.
- TORDOIR, W. F. A VAN SITTERT, N. J. Chapter 7 Organochlorines. In W.F. TORDOIR, M. MARONI A F. HE eds. *Health Surveillance of Pesticide Workers. A Manual for Occupational Health Professionals*. Amsterdam: Elsevier, 1994, p. 51-58.
- TPMC. Report on Carcinogens Background Document for Lead and Lead Compounds. Durham: 2003.
- TUR'YAN, Y. I. Microcells for voltammetry and stripping voltammetry. *Talanta*, 1997, 44(1), 1-13.
- URPI-SARDA, M., JAUREGUI, O., LAMUELA-RAVENTOS, R. M., JAEGER, W., *et al.* Uptake of diet resveratrol into the human low-density lipoprotein. identification and quantification of resveratrol metabolites by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 2005, 77(10), 3149-3155.
- URPI-SARDA, M., ZAMORA-ROS, R., LAMUELA-RAVENTOS, R., CHERUBINI, A., *et al.* HPLC-tandem mass spectrometric method to characterize resveratrol metabolism in humans. *Clinical Chemistry*, 2007, 53(2), 292-299.
- VALLEE, B. L. A FALCHUK, K. H. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiological Reviews*, 1993, 73(1), 79-118.
- VALLERIO, L. G. Mammalian iron metabolism. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 2007, 17(9), 497-517.
- VAN DEN BRINK, F. T. G., OLTHUIS, W., VAN DEN BERG, A. A ODIJK, M. Miniaturization of electrochemical cells for mass spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2015, 70, 40-49.
- VAN DER BEEK, E. J. Vitamin supplementation and physical exercise performance. *Journal of Sports Sciences*, 1991, 9, 77-90.
- VAN MAELE-FABRY, G., LANTIN, A. C., HOET, P. A LISON, D. Residential exposure to pesticides and childhood leukaemia: A systematic review and meta-analysis. *Environment International*, 2011, 37(1), 280-291.
- VANDENBERG, L. N., COLBORN, T., HAYES, T. B., HEINDEL, J. J., *et al.* Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocrine Reviews*, 2012, 33(3), 378-455.

- VASQUEZ, M. I., LAMBRIANIDES, A., SCHNEIDER, M., KUMMERER, K., *et al.* Environmental side effects of pharmaceutical cocktails: What we know and what we should know. *Journal of hazardous materials*, 2014, 279, 169-189.
- VERSTRAETEN, S., AIMO, L. A OTEIZA, P. Aluminium and lead: molecular mechanisms of brain toxicity. *Archives of Toxicology*, 2008, 82(11), 789-802.
- VILIKUS, Z. *Výživa sportovců a sportovní výkon*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 2012. 177 str. ISBN 978-80-246-2064-0.
- VIST, G. E. A MAUGHAN, R. J. Gastric emptying of ingested solutions in man: effect of beverage glucose concentration. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 1994, 26(10), 1269-1273.
- VOET, D. A VOET, J. G. *Biochemistry*. 4 vydání. Hoboken: John Wiley & Sons, 2011. 1520 str. ISBN 978-0-470-57095-1.
- VYSKOČIL, F. Tajemný exekutor neuronů odhalen. *Vesmír*, 2016, 95(3), 139-139.
- WALISZEWSKI, S. M., GOMEZ-ARROYO, S., INFANZON, R. M., VILLALOBOS-PIETRINI, R., *et al.* Comparison of organochlorine pesticide levels between abdominal and breast adipose tissue. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2003, 71(1), 156-162.
- WALSH, N. P., BLANNIN, A. K., ROBSON, P. J. A GLEESON, M. Glutamine, exercise and immune function - Links and possible mechanisms. *Sports Medicine*, 1998, 26(3), 177-191.
- WANG, J. *Analytical Electrochemistry*. 3 vydání. New York: Wiley-VCH, 2006. 272 str. ISBN 978-0-471-67879-3.
- WATERMAN, M. R. A LEPESHEVA, G. I. Sterol 14 alpha-demethylase, an abundant and essential mixed-function oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 338(1), 418-422.
- WEPNER, F., SCHEUER, R., SCHUETZ-WIESER, B., MACHACEK, P., *et al.* Effects of vitamin D on patients with fibromyalgia syndrome: A randomized placebo-controlled trial. *Pain*, 2014, 155(2), 261-268.
- WICKMAN, S., SIPILA, I., ANKARBERG-LINDGREN, C., NORJAVAARA, E., *et al.* A specific aromatase inhibitor and potential increase in adult height in boys with delayed puberty: a randomised controlled trial. *Lancet*, 2001, 357(9270), 1743-1748.
- WILLIAMS, M. H. Dietary supplements and sports performance: introduction and vitamins. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 2004, 1(2), 1-6.
- WILLIAMS, S. L., STROBEL, N. A., LEXIS, L. A. A COOMBES, J. S. Antioxidant requirements of endurance athletes: Implications for health. *Nutrition Reviews*, 2006, 64(3), 93-108.

- WILSON, G. J., WILSON, J. M. A MANNINEN, A. H. Effects of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) on exercise performance and body composition across varying levels of age, sex, and training experience: A review. *Nutrition & Metabolism*, 2008, 5, 1-17.
- WILSON, J. M., FITSCHEN, P. J., CAMPBELL, B., WILSON, G. J., *et al.* International Society of Sports Nutrition position stand: beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB). *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 2013, 10, 6/1-6/14.
- YAMANAKA, N., ODA, O. A NAGAO, S. Green tea catechins such as (-)-epicatechin and (-)-epigallocatechin accelerate Cu²⁺-induced low density lipoprotein oxidation in propagation phase. *FEBS letters*, 1997, 401(2-3), 230-234.
- YANEZ, M., FRAIZ, N., CANO, E. A ORALLO, F. Inhibitory effects of *cis*- and *trans*-resveratrol on noradrenaline and 5-hydroxytryptamine uptake and on monoamine oxidase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 344(2), 688-695.
- YEN, G. C., DUH, P. D. A TSAI, H. L. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food Chemistry*, 2002, 79(3), 307-313.
- ZARN, J. A., BRUSCHWEILER, B. J. A SCHLATTER, J. R. Azole fungicides affect mammalian steroidogenesis by inhibiting sterol 14 α -demethylase and aromatase. *Environmental Health Perspectives*, 2003, 111(3), 255-261.
- ZATTA, P. F. A ALFREY, A. C. *Aluminum Toxicity in Infants' Health and Disease*. 1. vydání. Singapore: World Scientific, 1997. ISBN 981-02-2914-3.
- ZETTERSTEN, C., CO, M., WENDE, S., TURNER, C., *et al.* Identification and characterization of polyphenolic antioxidants using on-line liquid chromatography, electrochemistry, and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(21), 8968-8977.
- ZHOU, F. A VAN BERKEL, G. J. Electrochemistry combined online with electrospray mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 1995, 67(20), 3643-3649.
- ZIMMERMAN, H. J. *Hepatotoxicity: The Adverse Effects of Drugs and Other Chemicals on the Liver*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. 789 str. ISBN 978-0781719520.

7 Publikační výstupy spojené s tématem práce, na nichž se autorka podílela

8 Přiložené publikace k tématu