

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY



DIPLOMOVÁ PRÁCE
INTERAKCE CHALKONŮ S PŘECHODNÝMI KOVY I.

Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Kateřina Macáková, Ph.D.

Vedoucí katedry: prof. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

CHARLES UNIVERSITY
FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRÁLOVÉ
DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL BOTANY



DIPLOMA THESIS

INTERACTION OF CHALCONES WITH TRANSITION METALS I.

Supervisor: Assoc. Prof. Ing. Kateřina Macáková, Ph.D.

Head of Department: Prof. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Hradec Králové, May 2021

Jana Faberová

Poděkování:

Touto cestou bych ráda poděkovala své školitelce doc. Ing. Kateřině Macákové, Ph.D. za odborný dohled, poskytnuté materiály, pomoc při experimentálním měření, tvorbu grafů a především za laskavý přístup a cenné rady při vypracování diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat členům výzkumné skupiny kardiiovaskulární a respirační farmakologie a toxikologie za poskytnutí látek použitých při experimentálním měření a celé katedře Farmaceutické botaniky za poskytnutí laboratoře a potřebného vybavení. Na závěr bych ráda poděkovala svým rodičům za podporu a zázemí při studiu. Tato práce vznikla za podpory projektu OPVVV 02_16_017: CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_017/0002682: Modernizace laboratoře buněčných interakcí s látkami přírodního původu (MOLABI), MŠMT ČR/Univerzita Karlova v Praze.

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ:

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Tato práce nebyla použita k získání jiného či stejného titulu.“

Hradec Králové, 2021

Jana Faberová

OBSAH

1	Úvod.....	8
2	Cíl práce	10
3	Teoretická část.....	11
3.1	Význam železa pro živý organismus	11
3.1.1	Metabolismus železa	11
3.1.1.1	Systémová regulace metabolismu železa.....	13
3.1.2	Funkce železa v lidském těle.....	13
3.1.3	Změny hladiny plazmatického železa	14
3.1.3.1	Nedostatek železa v organismu.....	14
3.1.3.2	Nadbytek železa v organismu	14
3.2	Význam chelatace iontů kovů.....	15
3.3	Význam redukce iontů kovů.....	16
3.4	Chalkony.....	16
3.4.1	Biosyntéza chalkonů	18
3.4.2	Metabolismus chalkonů v lidském organismu	18
3.4.3	Využití komplexů chalkonů v lidském organismu.....	19
3.4.4	Biologické účinky testovaných látek.....	19
3.4.4.1	Isoliquiritigenin.....	19
3.4.4.2	Likochalkon A	20
3.4.4.3	Floretin.....	21
3.4.4.4	Florizin.....	22
3.4.4.5	Naringin dihydrochalkon	22
3.4.4.6	Neohesperidin dihydrochalkon	23
4	Experimentální část	25
4.1	Pomůcky	25
4.1.1	Použitý materiál.....	25

4.1.2	Použité chemikálie	25
4.1.3	Testované látky	25
4.1.4	Přístrojové vybavení.....	26
4.2	Příprava roztoků	26
4.3	Standardní operační postupy	26
4.3.1	Kontrola připraveného základního roztoku železnatých iontů.....	26
4.3.2	Kontrola připraveného základního roztoku železitých iontů	27
4.3.3	Kalibrační křivka.....	27
4.3.4	Chelatace železnatých iontů v pufru o pH 4,5; 5,5 a 6,8.....	28
4.3.5	Chelatace železnatých iontů v pufru o pH 7,5	29
4.3.6	Chelatace železitých iontů v pufru o pH 4,5	30
4.3.7	Chelatace železitých iontů v DMSO	32
4.3.8	Redukce železitých iontů v pufru o pH 4,5; 5,5; 6,5 a 7,5.....	33
4.3.9	Redukce železitých iontů v DMSO	34
4.4	Statistická analýza	36
5	Výsledky.....	37
5.1	Kalibrační křivka	37
5.2	Chelatační účinky testovaných látek	37
5.3	Redukční účinky testovaných látek	41
6	Diskuze.....	43
7	Závěr.....	50
8	Seznam použitých zkratk.....	51
9	Použitá literatura a zdroje.....	53
10	Seznam obrázků	58
11	Seznam tabulek	60
12	Seznam rovnic.....	61
	Abstrakt	62

1 Úvod

Železo je kovový prvek, který se hojně vyskytuje v živých organismech. V periodické tabulce prvků je umístěno v první periodě mezi přechodnými kovy s nepárovými d-elektrony. Atom železa je schopen velmi snadno vázat a uvolňovat elektron a tak měnit své mocenství z dvojmocné feroformy na trojmocnou ferioformu. Právě flexibilní elektronová struktura železa vede k jeho širokému využití. Ze všech biogenních kovů se v lidském těle nachází v nejvyšším množství a je klíčovým prvkem pro přežití většiny jednobuněčných organismů, rostlin a savců [1, 2]. Umožňuje funkci životně důležitých enzymů, je součástí hemoproteinů s afinitou k molekulám kyslíku, podílí se na funkci dýchacího řetězce, je nezbytné pro buněčný cyklus a syntézu nukleových kyselin. Nevhodně nízká nebo vysoká hladina železa v těle však vede k rozvoji celé řady onemocnění. Železo může být díky své vysoké reaktivitě pro buňku toxické a v rámci Fenotonovy reakce způsobovat vznik volných radikálů. Nejvíce poškozenými orgány při nadbytku železa jsou játra, slinivka, srdce a endokrinní žlázy [1].

Chalkony jsou rostlinné polyfenoly, sekundární metabolity rostlin, široce obsažené ve fotosyntetizujících buňkách. V přírodě se tyto rostlinné fenolické látky vyskytují buď konjugované s jedním nebo více cukernými zbytky připojené přes hydroxylovou skupinu, nebo ve formě aglykonu [3]. Tvoří běžnou součást lidské stravy a nalézt je můžeme např. v ovoci, zelenině, semenech, čaji či víně. Chalkony, jakožto prekurzory flavonoidů, mají pro přežití rostlin klíčový význam. Chrání rostliny před UV-B zářením, zvyšují atraktivitu rostlin pro opylovače, podílejí se na fotosyntéze a chrání rostlinu před napadením houbami [4]. Kromě toho také chalkony vykazují široké spektrum biologické aktivity. Mají antioxidační, protizánětlivý, protirakovinný, antimikrobiální, hepatoprotektivní, antidiabetický a anti-osteoporotický účinek na lidský organismus [5, 6]. Některé chalkony chelatují železo i měď a tím se významně podílejí na prevenci oxidačního stresu a vzniku volných radikálů. Kontakt železa s redukčním činidlem (chalkonem) však může vyvolat také redukci železitých iontů na železnaté, a tím způsobit vznik volných radikálů [5].

Chalkony jsou obecně považovány za antioxidanty. Chelatace přechodných kovů se může na antioxidační aktivitě podílet stejně, jako je tomu u flavonoidů, ale na druhou stranu jejich redukce může působit prooxidačně [7]. V rámci této diplomové práce byla proto zkoumána železo-chelatační a železo-redukční aktivita některých vybraných chalkonů, které se běžně vyskytují v ovoci (florethin, florizin), běžně používaných rostlinných drogách

(isoliquiritigenin, likochalkon A) nebo jsou používány jako sladidla (neohesperidin dihydrochalkon, naringinu dihydrochalkon).

2 Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo stanovit schopnost chelatovat železité a železnaté ionty a železo-redukující účinky u vybraných chalkonů v prostředí o různých pH (4,5; 5,5; 6,5 a 7,5) a na základě získaných výsledků odvodit vztah mezi strukturou testovaných látek a železo-chelatační a železo-redukční aktivitou. Pro vypracování diplomové práce byly vybrány tyto látky: isoliquiritigenin, naringin dihydrochalkon, neohesperidin dihydrochalkon, likochalkon A, floretin a florizin.

3 Teoretická část

3.1 Význam železa pro živý organismus

Tělo zdravého dospělého člověka obsahuje 3-5 g železa, což zahrnuje 35 mg/kg Fe u žen a 45 mg/kg u mužů. Z celkového množství železa je 60-70 % zabudováno v molekule hemoglobinu cirkulujících červených krvinek, 3-7 mg je navázáno na transportní protein transferin vyskytující se v plazmě, 400 mg se nachází v proteinech obsahujících železo (myoglobin, cytochrom, enzymatické systémy) a přibližně 1 g tvoří zásoby železa ve slezině, kostní dřeni a enterocytech [8]. Ztráty železa činí u mužů asi 1 mg za den a u žen až 2 mg [9]. Prostřednictvím potravy přijímáme denně asi 1 až 2 mg železa. Toto množství představuje přibližně 10 % železa, které se nachází v průměrné denní stravě dospělého člověka [10]. Dvě třetiny z absorbovaného železa pocházejí z hem, nacházejícího se především v živočišné stravě, zbývající frakce je anorganická. Proces erythropoézy spotřebuje až 30 mg železa denně [11].

3.1.1 Metabolismus železa

Absorpce železa z potravy je zprostředkována kartáčovým lemlem duodenálních enterocytů nacházejících se ve slizničním epitelu počátečního úseku tenkého střeva. Vstřebávání železa je zpětnovazebně regulováno. Celkové množství železa v těle se řídí prostřednictvím resorpce, jelikož výdej železa organismus regulovat neumí. Trojmocné nehemové železo (Fe^{3+}), které je v potravě obsaženo častěji, je ve střevě redukováno na železo dvojmocné (Fe^{2+}), za účasti redukčních činidel, např. vitamínu C (kyseliny askorbové) nebo aminokyselin cysteinu a histidinu. Tuto reakci katalyzuje duodenální enzym cytochrom B. Dvojmocné železo následně vstupuje do enterocytu díky transportéru lokalizovaném na apikální membráně DMT1 (DMT1 – divalent metal transporter 1). DMT1 je jednořetězcový transmembránový glykoprotein, který může kromě železa transportovat i jiné dvojmocné kovy. Jeho exprese se zvyšuje při nedostatku železa. Hem je z lumen duodena absorbován do buňky za pomoci transportéru HCP (heam carrier protein). Uvolnění železa z hemu zprostředkovává enzym hemoxygenáza. V enterocytu se železo objevuje ve dvou formách, mezi kterými je ustanovena dynamická rovnováha. Mezi tyto formy patří volné dvojmocné železo, jehož hladina je díky toxicitě držena na nízké úrovni, a zásobní trojmocné železo. Při výstupu z buňky se železo oxiduje na méně toxické trojmocné železo. Oxidaci provádí molekula hephaestinu lokalizovaná na bazolaterální membráně enterocytu. Trojmocné železo vstupuje do krve díky ferroportinu, exportéru železa. V plazmě se železo

váže na specifický přenašeč. Transportní molekulou železa je jednořetězcový glykoprotein transferin, obsahující dvě strukturálně podobná, ale funkčně odlišná vazebná místa pro atomy železa. Jedna molekula transferinu je schopná vázat až dva atomy trojmocného železa. Za normálních podmínek je transferin saturován pouze z 1/3. Při nedostatku železa saturace transferinu klesá, naopak při nadbytku železa v organismu jeho saturace stoupá. Molekula transferinu se váže na specializované transferinové receptory TfR a TfR2, které jsou umístěné na membráně buněk. Nej hustší výskyt transferinových receptorů můžeme pozorovat na buňkách hemopoézy. Dojde-li k rozvoji anémie, obvykle se kromě sérové koncentrace železa snižuje i koncentrace transferinu. Zásobní železo je v buňkách uloženo ve formě feritinu, tvořeného dvěma typy podjednotek označovaných jako L- (Light, Liver) a H- (Heavy, Heart) feritin. Jednotlivé feritiny se od sebe liší zastoupením L- a H- podjednotek. Feritin bohatý na L- podjednotky přijímá železo pomaleji a déle jej skladuje, naopak feritin bohatý na H- podjednotky přijímá železo rychle a rychle jej uvolňuje. Oba typy podjednotek se formují do schránek složených z 24 molekul, přitom každá ze schránek disponuje schopností vázat až tisíce atomů Fe^{3+} [1, 12].

Metabolismus železa se může jevit jako z části uzavřený koloběh. Lidské tělo se snaží maximálně využít železo, které se již v organismu nachází, a za tímto účelem recykluje železo ze zaniklých erytrocytů v retikulo-endoteliálním systému. Nepostradatelnou součástí tohoto procesu jsou makrofágy ve slezině, které fagocytují odumírající erytrocyty a rozkládají v nich obsažený hemoglobin na bílkovinný řetězec globin a hem, ze kterého je následně uvolněno dvojmocné železo. Dvojmocné železo je oxidováno na trojmocné železo prostřednictvím ceruloplasminu a po výstupu z makrofágů se váže na transferin. Denně je takto zpracováno až 20 mg železa, což je více než desetinásobek železa vstřebaného [1, 11].

Těla savců vylučování železa regulovat neumí. Homeostáza železa v těle je tedy regulována pouze na úrovni absorpce. Fyziologické ztráty železa vznikají odlupováním buněk a menstruačním krvácením. Denně tímto způsobem tělo přichází o 1-2 mg železa. Zdravá žena ztrácí při menstruaci přibližně 50-80 ml krve, což navyšuje denní úbytek železa o 1-2 mg oproti mužům. V určitých etapách lidského života se můžeme setkat se zvýšenými nároky na spotřebu železa. Mezi tyto stavy patří těhotenství, kojení a růst. Vyšší nároky na příjem železa mají i sportovci. Ve srovnání s tím bývají patologické ztráty železa nejčastěji způsobeny chronickým krvácením, opakovaným průjmem, léky (kyselina acetylsalicylová, glukokortikoidy, nesteroidní antirevmatika, chlorid draselný), hemodialýzou, hemoglobinurií a opakovanými krevními odběry. Nedostatek železa v organismu způsobuje i jeho snížení

přísun v potravě (malnutrice), poruchy příjmu a transportu živin (malabsorpce, maldigesce) a chronický zánět. Během zánětu dochází ke snížení absorpce železa z gastrointestinálního traktu a zároveň klesá i množství železa uvolněného z makrofágů. Bilance železa je napjatá zejména u těhotných a kojících žen, při dospívání a u vegetariánů [8, 13].

3.1.1.1 Systémová regulace metabolismu železa

Důležitou roli v řízení metabolismu železa a udržení homeostázy hraje hepcidin. Hecpidin je peptidový hormon složený z 25 aminokyselin, který je syntetizován převážně v játrech. Kromě hepatocytů, které jsou hlavním zdrojem hepcidinu, syntetizují tento peptidový hormon i další tělní struktury. Mezi ně patří např. makrofágy a adipocyty. Produkci hepcidinu stimuluje plazmatický transferin nebo hepatocyty prostřednictvím nejasných mechanismů. Tento peptidový hormon je schopen inhibovat exportér železa ferroportin umístěný na buňkách. Inhibice ferroportinu vede ke snížení výstupu železa z buněk do kompartmentu plazmy ze tří hlavních cest: enterocytů v duodenu, makrofágů ve slezině a hepatocytů. V případě, že se množství železa v organismu zvýší nad tolerovanou hladinu, dochází ke zvýšení produkce hepcidinu, naopak při nedostatku železa se jeho syntéza snižuje. Dlouhodobě zvýšená koncentrace hepcidinu v těle způsobuje pokles železa v plazmě a celkový nedostatek železa v organismu. Naopak nedostatek hepcidinu vede k trvale zvýšené absorpci železa z gastrointestinálního traktu a jeho nadbytku [1, 14].

3.1.2 Funkce železa v lidském těle

Atom železa je nedílnou součástí mnoha životně důležitých struktur a biochemických procesů odehrávajících se v tělech savců. K této úloze jej předurčuje fakt, že dvojmocné železo může vystupovat jako donor elektronů a trojmocné železo jako jejich akceptor. Pravděpodobně nejvýznamnější roli tento biogenní kov zaujímá v procesu erythropoézy, kde vystupuje jako nezbytná součást červeného transportního metaloproteinu červených krvinek hemoglobinu. Železo se tudíž přímo podílí na transportu kyslíku v organismu. Mezi další struktury obsahující atom železa patří i myoglobin, cytochrom a další enzymy, jako například akonitáza, klíčový enzym citrátového cyklu. Další vitální funkce, které atom železa zabezpečuje, zahrnují přenos elektronů a kyslíku při buněčném dýchání, syntézu nukleových kyselin, řízení buněčné proliferace a diferenciaci. Zajímavou úlohu železo zaujímá i při procesu formování myelinu a dendritů, což může vést k ovlivnění učení a paměti. Zájem vědců o tento kov zvyšuje i úloha železa při stárnutí tkání, v procesu neurodegenerace a maligního bujení, v rozvoji aterosklerózy a správné funkci imunitního systému. Kromě pozitivního účinku železa na lidské tělo se však můžeme setkat i s účinky toxickými.

Předposlední slupka atomu železa je neúplně obsazena elektrony, což železu umožňuje podílet se na vzniku volných radikálů, které poškozují buňky. Právě železnatý ion se uplatňuje v tzv. Haber-Weiss-Fentonově reakci, kdy Fe^{2+} iniciuje tvorbu peroxidu vodíku, který se následně podílí na vzniku velmi reaktivního hydroxylového radikálu [2, 12].

3.1.3 Změny hladiny plazmatického železa

K patologickému snížení hladiny plazmatického železa dochází z mnoha různých důvodů, mezi něž řadíme chronické krvácení, opakující se průjmy, maligní nádory, onemocnění ledvin, infekce a chronické záněty. Zvýšená hladina plazmatického železa je naopak zapříčiněna neschopností kostní dřene železo zužitkovat, nedostatkem faktorů potřebných pro tvorbu erytrocytů, nepřiměřeným parenterálním podáním železa a po mnohočetných krevních transfuzích [10].

3.1.3.1 Nedostatek železa v organismu

Anémie z nedostatku železa neboli sideropenická anémie je nejběžnějším zdravotním problémem způsobeným nedostatečným příjmem živin. Tento typ anémie je charakteristický poklesem střední hodnoty hemoglobinu v erytrocytu (MCH – mean cell hemoglobin) a střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytu (MCHC – mean cell hemoglobin concentration) pod normální referenční hodnoty laboratoře. Dalším znakem hypochromní anémie je i mikrocytóza, tj. poklesem středního objemu erytrocytu (MCV – mean cell volume) [2]. Pokud je tělo chudé na přítomnost železa, dochází nejprve k vyčerpání jeho zásob v organismu, což se projeví snížením sérové koncentrace ferritinu pod $12 \mu\text{g/l}$. Dalším signálem může být zvýšení koncentrace transferinu s poklesem jeho sycení pod 15 %. Mezi symptomy anémie tohoto typu patří: únava, parestezie, pálení až bolest jazyka a koutků úst, dysfagie, snížení pracovní kapacity, třepení vlasů, ovlivnění kognitivního vývoje u dětí a koilonychie (lžičkovité nehty) [8, 15].

3.1.3.2 Nadbytek železa v organismu

Při zvýšení plazmatické koncentrace železa v těle dochází k jeho kumulaci v parenchymových buňkách jater, pankreatu, myokardu a dalších orgánů, což vede k jejich poškození. Hromadění železa v organismu označujeme jako hemochromatózu. Primární hemochromatóza je autozomálně recesivní onemocnění, projevující se zvýšenou absorpcí železa ze střeva, která vede k rozvoji jaterní cirhózy, diabetu mellitus a hypogonadismu. Sekundární hemochromatóza vzniká jako následek opakovaných transfuzí, nepřiměřeného podání železa nebo hemolytické anémie [10]. Hemochromatózu lze léčit prostřednictvím

chelatační terapie, kdy dochází k podávání chelatačního činidla za účelem odstranění kovu z těla. Primární využití chelátorů deferoxaminu, deferipronu a deferosiroxu je léčba hemochromatózy spojené s přetížením organismu železem u pacientů s talasemia major (TM) a talasemia intermedia (TI). Přetížení železem u tohoto onemocnění je způsobeno chronickým zvýšením absorpce železa v důsledku dědičného onemocnění krve, které vzniká na základě poruchy tvorby některé ze složek krevního barviva hemoglobinu. Toxicita železa, při onemocnění TI, se obvykle projevuje ve věku kolem 30 až 40 let. Při onemocnění TM se s projevy intoxikace železem setkáváme už ve věku 10 let. V současnosti používané chelátory železa umožňují pouze zvýšit vylučování železa z organismu, ale neumožňují zabránit zvýšení absorpce železa ze střev. Budoucí léčba talasémie by mohla zahrnovat nejen zvýšené vylučování železa, ale i prevenci jeho absorpce. Limitujícím faktorem vývoje nových léčiv z oblasti chelátorů železa je především jejich toxicita [16]. Tvorba kovového chelátu může mít biologické důsledky, které jsou mnohem závažnější než vysoká hladina kovu v organismu [17]. Mezi nežádoucí účinky těchto léčiv patří např. fatální selhání ledvin, jater a kostní dřeně, agranulocytóza, kožní vyrážky a žaludeční intolerance. Deferoxamin by se také mohl jevit jako účinný prostředek k léčbě otoků u pacientů s intracerebrálním krvácením. Nicméně zatím neexistuje dostatek důkazů o bezpečnosti a přínosu této léčby [18].

3.2 Význam chelatace iontů kovů

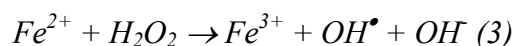
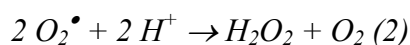
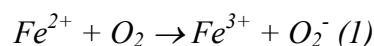
Chelatační činidla jsou organické nebo anorganické sloučeniny schopné vázat kovové ionty za vzniku složitých komplexů nazývaných „cheláty“. Tyto komplexy jsou tvořeny centrálním atomem, tedy přechodným kovem, a ligandy, které se na centrální atom váží dvěma či více koordinačně kovalentními vazbami. Na tvorbě chelátu se v lidském těle podílí hlavně sodík, hořčík, měď, zinek, mangan, železo a kobalt. Atomy či ionty přechodných kovů mají neobsazené valenční orbitály, tudíž mohou vystupovat jako akceptory elektronů. Naopak ligandy elektrony poskytují. Stabilita jednotlivých komplexů se liší, a je závislá na vlastnostech jak chelatačního činidla tak chelatovaného kovu. Ionty kovů s nižší afinitou k ligandům jsou vytěsňovány kovy s vyšší afinitou [19].

Praktické využití chelatačních činidel v medicíně spočívá v jejich schopnosti vázat ionty těžkých kovů, za vzniku rozpustných komplexů, které jsou z těla snáze vyloučeny. Chelatační terapie se tedy stává důležitým nástrojem pro úpravu koncentrací kovů v lidském těle. Ideální chelátor by měl být vysoce rozpustný ve vodě, odolný vůči biotransformaci a měl by být schopný dosáhnout cílového orgánu. Avšak i přes všechny známé parametry, které by měl

ideální chelátor splňovat, je velmi těžké nalézt vhodné molekuly pro chelatační terapii. Látky splňující všechny požadované kvality *in vitro* nemusejí být *in vivo* stejně úspěšné. A to buď z důvodu toxicity, konkurence endogenních látek nebo pH. Mezi látky tvořící základ chelatační terapie patří například dimerkaprol, edetan vápenato-disodný, kyselina diethylentriamin-pentaoctová, D-penicilamin, deferoxamin, deferipron, triethyltetraamin (TETA) a další [19].

3.3 Význam redukce iontů kovů

Předposlední elektronový obal atomu železa je obsazen pouze neúplně, což umožňuje železu vystupovat jako donor i akceptor elektronů. Tato schopnost železa zapříčiňuje, že se může podílet na vzniku volných radikálů a být pro buňku toxické. Při Haber-Weiss-Fentonově reakci (Rov. 1) dochází k oxidaci volného Fe^{2+} na Fe^{3+} za vzniku peroxidu vodíku, který následně iniciuje tvorbu vysoce reaktivního hydroxylového radikálu. Vznik volných radikálů následně vede k poškození organismu, rozvoji různých onemocnění a stárnutí [12].

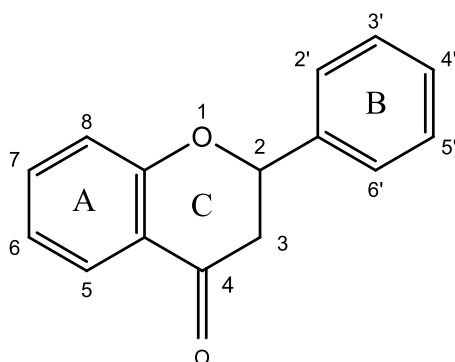


Rovnice 1: Haber-Weiss-Fentonova reakce, převzato [12]

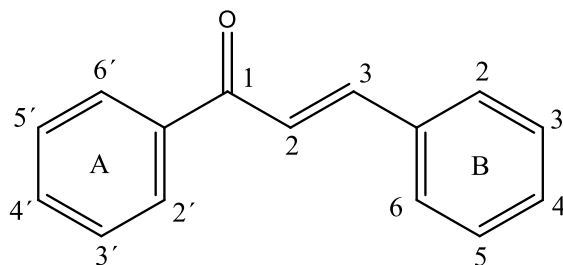
3.4 Chalkony

Chalkony jsou rostlinné polyfenoly patřící do rodiny flavonoidů (Obr. 1), sekundárních metabolitů rostlin. Slovo „chalkon“ je odvozeno z řeckého slova „chalcos“ znamenající „bronz“. Termín chalkon se obecně vztahuje k chemické struktuře s α,β -nenasyceným ketonovým systémem. Základní skelet chalkonů tvoří 1,3-difenylprop-2-en-1-on (Obr. 2), označovaný také jako chalkonoid [5, 6]. Chalkony mohou existovat ve dvou izomerních formách *trans* (E) a *cis* (Z), z nichž *trans* izomer je považován za termodynamicky stabilnější. Pro všechny podtřídy flavonoidů s výjimkou chalkonoidů platí, že je krátký uhlíkový řetězec spojen s benzenovým kruhem buď přímo, nebo přes kyslíkový můstek, což vede ke vzniku třetího pětičlenného nebo šestičlenného kruhu C [20]. Chalkony vykazují široké spektrum biologických aktivit připisovaných zejména přítomnosti nenasyčeného karbonylového systému [5, 6]. Tato část molekuly se může chovat jako substituovaný nenasyčený

karbonylový ligand schopný chelátovat kovové ionty, a tím vytvářet komplexní sloučeniny. Existují tři hlavní domény chalkonů pro interakci s kovy: funkční skupiny umístěné na kruhu A a B, keto(-enolová) skupina a olefinová skupina [20]. Z hlediska biologické aktivity chalkony disponují protinádorovou, protizánětlivou, antibakteriální, antituberkulózní, antidiabetickou, antioxidační, antimikrobiální, antivirovou, antimalarickou a neuroprotektivní aktivitou [5, 6]. V klinické praxi dosud našlo uplatnění pouze několik látek z řad chalkonů, nejedná se však o přírodní chalkony. Metochalkon se dříve využíval jako choleretikum, látka zvyšující vylučování žluči z jater. Sofalcon má protivředový a mukoprotektivní účinek. [5].



Obrázek 1: 2-fenyl-benzo[α]pyran, flavanon, základní skelet flavonoidů [4]



Obrázek 2: difenylprop-2-en-1-on, základní skelet chalkonů [5]

Bylo zaznamenáno, že jednou z prospěšných vlastností chalkonů je i jejich antioxidační aktivita. Chalkony jsou schopné vylučovat volné radikály za pomoci uvolněného vodíkového atomu, který reaguje s hydroxylovým radikálem za vzniku molekuly vody. Dále mohou chalkony prostřednictvím chelatace iontů kovů zabránit vzniku volných radikálů, a tím se podstatně podílet na prevenci oxidačního stresu buněk [21, 22]. Výzkum provedený v roce 1999 naznačil, že hydroxylované chalkony, které obsahují 3,4-dihydroxycinnamoylovou skupinu vykazují významný inhibiční efekt na 5-lipoxygenázů a peroxidaci lipidů. Naproti tomu chalkony bez hydroxylové skupiny v poloze 3 a 4, včetně 2-hydroxychalkonů, vykazují pouze slabou antioxidační aktivitu. Stejně tak nebyla zaznamenána významná antioxidační

aktivita u chalkonů obsahujících hydroxylovou skupinu v poloze 4 a 6 [23]. Studie z roku 2018 uvádí, že methoxylace v poloze ortho-OH zvyšuje schopnost chalkonů přenášet elektrony a atom vodíku, čímž zvyšuje jejich antioxidační aktivitu. Naopak glykosylace hydroxylových skupin vede ke snížení antioxidační aktivity, ale také omezuje schopnost uvolnění vodíkového atomu sterickým bráněním. Dále bylo zjištěno, že 2',6'-dihydroxychalkony mají vyšší antioxidační aktivitu než 2',4'-dihydroxychalkony díky rezonanci se sousední ketoskupinou [24].

Rostlinné chalkony mohou kromě antioxidační aktivity prospěšné pro zachování lidského zdraví oplývat i nevhodnou peroxidační aktivitou, která vychází z jejich redukčního potenciálu. Kontakt volného dvojmocného železa s redukčním činidlem (chalkonem) může vyvolat přeměnu Fe^{2+} iontů na Fe^{3+} , což katalyzuje vznik volných radikálů v intracelulárním prostředí v rámci Fentonovy reakce [1, 25].

3.4.1 Biosyntéza chalkonů

Rostlinné polyfenoly vznikají pouze z malého počtu několika základních biogenetických drah, vedoucích k omezenému počtu klíčových meziproductů, z nichž následně velmi jednoduchými enzymatickými transformacemi vzniká velké množství (stovek až tisíců) periferních derivátů. Vznik flavonoidů a chalkonů je z hlediska biogenetické dráhy odvozen od kyseliny šikimové v kombinaci s acetátovou biosyntetickou cestou. Klíčovým meziproductem je kyselina skořicová [26]. Chalkonsyntáza je rostlinný enzym zodpovědný za biosyntézu chalkonů. Tvoří chalkony přenosem kumaroylové skupiny z 4-kumaroyl-koenzymu A na Cys 164. Kyselina skořicová navázaná na koenzym A se prodlužuje prostřednictvím polyketidové reakce o šest uhlíků. Po vytvoření tetraketidu vázaného na thioester dochází k cyklizaci Claisenova typu za vzniku nového kruhového systému [5].

3.4.2 Metabolismus chalkonů v lidském organismu

Většina flavonoidů je v rostlinách přítomna ve formě β -glykosidů. Tyto glykosidy musejí být před absorpcí do systémového řečiště podrobeny deglykosylaci, která se odehrává v lumen střev působením dvou enzymů: laktáza-florizin hydrolázy a β -glukosidázy. Enzym laktáza-florizin hydroláza je lokalizován na povrchu enterocytů. Aglykony vzniklé prostřednictvím tohoto enzymu jsou uvolněny do lumen střev a pasivní difuzí prostupují střevní membránou. Enzym β -glukosidáza je lokalizována v nitru enterocytu. Hydrofilní glykosidy jsou tedy za účelem deglykosylace nuceny vstupovat do enterocytu aktivním

transportem prostřednictvím SGLT1 (Sodium-glucose transporter 1). Glykosidy, které nejsou substrátem enzymu laktáza-florizin hydrolázy a β -glukosidázy jsou transportovány do tlustého střeva a tam rozloženy střevními bakteriemi [21]. Střevní bakterie pravděpodobně rozkládají i některé chalkony, jako např. neohesperidin dihydrochalkon a floretin dihydrochalkon, za vzniku kyselých hydroxyfenylpropionových derivátů, které se vstřebávají ve slepém střevě [27, 28].

3.4.3 Využití komplexů chalkonů v lidském organismu

Bylo zjištěno, že kovové komplexy chalkonů s vanadem, manganem, kobaltem, zinkem a chromem inhibují mikrobiální růst např. u *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* a *Saccharomyces cerevisiae*. U některých komplexů s železem byla pozorována nematocidní aktivita. Cytotoxický účinek byl zaznamenán u komplexů s rutheniem, železem, chromem a kobaltem. Komplexy s rutheniem také prokázaly potenciál inhibovat růst rakovinných buněk se silnou selektivní cytotoxickou reakcí proti rakovině vaječnicků. Tyto komplexy měly i pozitivní vliv na inhibici viru HIV. Studie publikované o této problematice ukazují, že tyto látky mají vysoký potenciál jako protirakovinné, protinfekční (antimikrobiální, antivirové, antiamoebické, antimalarické, antituberkulózní a nematocidní) a antioxidační látky. Problémem, který by však mohl bránit použití těchto komplexů při léčbě lidí, by mohla být jejich nízká rozpustnost ve vodě [25, 29].

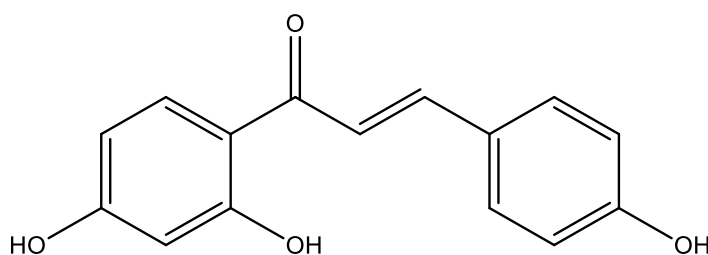
3.4.4 Biologické účinky testovaných látek

Pro tuto práci byly vybrány některé látky ze skupiny chalkonů, meziproduktů syntézy flavonoidů, za účelem zjištění, zda jsou schopny chelatovat ionty železa stejně jako strukturně složitější flavonoidy.

3.4.4.1 Isoliquiritigenin

Isoliquiritigenin (ILG, Obr. 3) je polyfenol extrahovaný z kořene a oddenků rostliny *Glycyrrhiza glabra* L., *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. a *Glycyrrhiza inflata* Batalin. Kořen lékořice obsahuje kolem 400 různých chemických látek jako např. saponiny, flavanony, chalkony, kumariny a jejich glykosidy. Mezi farmakologické vlastnosti ILG patří antioxidační, protizánětlivý, protirakovinný, antimikrobiální, hepatoprotektivní, anti-diabetický a anti-osteoporotický účinek [30]. Expozice ILG vede k inhibici růstu folikulů ve vaječnicích a narušuje produkci steroidů. Dále bylo zjištěno, že ILG inhibuje růst a aromátázovou aktivitu buněk rakoviny prsu, a má tedy potenciál stát se chemoterapeutikem používaným při léčbě tohoto onemocnění. Spekuluje se i o jeho využití při léčbě rakoviny

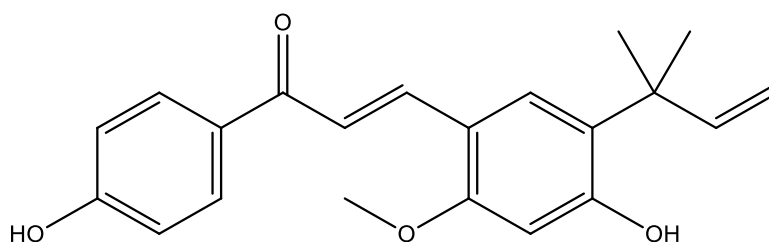
prostaty a tlustého střeva [31]. U myších modelů byla detekována významná antiangiogenní aktivita ILG, která otevřela nové možnosti farmakoterapie při léčbě očních nevasculárních onemocnění [32]. Studie z roku 2008 (Jang et al., 2008) poukázala na možnou schopnost ILG blokovat účinek kokainu a snižovat poškození neuronových buněk vyvolané kokainem. Tyto výsledky naznačují možnost použití ILG při léčbě drogové závislosti [30]. Samotná lékořice se používá jako ochucovadlo do cukrovinek, tabáku, zubních past a bylinných čajů. V tradiční medicíně si lékořice našla místo i jako prostředek při léčbě peptických vředů, faryngitidy, bolesti břicha, astmatu, nespavosti a malárie [31]. Průměrný denní příjem ILG prostřednictvím stravy nebo doplňků se odhaduje na 1 až 2 mg/kg [30].



Obrázek 3: Isoliquiritigenin [30]

3.4.4.2 Likochalkon A

Likochalkon A (LCH A, Obr 4.) je látka izolovaná z kořene rostlin *Glycyrrhiza glabra* L., *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. a *Glycyrrhiza inflata* Batalin. Lékořice je pod názvem Gan Cao používána v tradiční čínské medicíně a vykazuje antimikrobiální, protizánětlivý a antioxidační účinek. Výsledky studií na myších z roku 1994 prokázaly, že LCH A disponuje významnou antimalarickou aktivitou proti infekci *P. falciparum* u lidí a *P. yoelii* u myši. Je tedy pravděpodobné, že aktivní látky používané v tradiční medicíně nabídnou nové možnosti pro vývoj antimalaritik [33]. LCH A se také projevil jako specifický inhibitor izoformy JNK1 (c-Jun N-terminal kinase). Bylo zjištěno, že JNK1, JNK2 a JNK3 hrají zásadní roli v rozvoji metabolicko-kognitivních změn a neurologických poruch jako je epilepsie [34]. LCH A lze využít i při léčbě a prevenci orálních onemocnění jako např. zubního kazu, paradentózy, gingivitidy, kandidózy a aftů. LCH A inhibuje tvorbu biofilmu *Porphyromonas gingivalis*, a zabraňuje průchodu kvasinkových hyf (*Candida albicans*) [35].

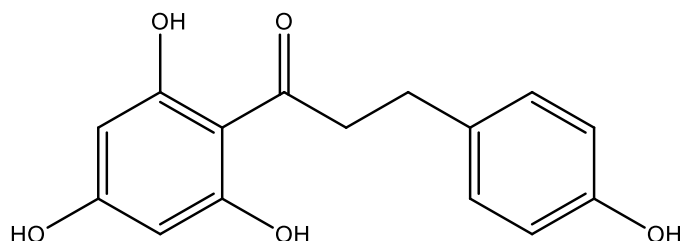


Obrázek 4: Likochalkon A [33]

3.4.4.3 Floretin

Plody listnatých stromů rodu *Malus* L. jsou bohatým zdrojem bioaktivních látek podporujících lidské zdraví. Častá konzumace jablek může dokonce souviset se snížením rizika rakoviny, kardiovaskulárních onemocnění a cukrovky typu 2. Jednou z látek obsažených ve slupkách a buničině jablek a hrušek je i polyfenol floretin (Obr. 5) [36, 37]. Množství floretinu obsažené v jablku je především závislé na jeho odrůdě. Zdroje uvádějí, že ve slupce některých odrůd jablek se může nacházet až 420 mg/kg floretinu. Tuto látku lze najít i v dalších rostlinách jako je např. *Fallopia japonica* (Houtt.) Ronse Decr., *Hovenia acerba* Lindl. nebo *Loiseleuria procumbens* (L.) Loisel [38]. Mezi jeho biologické aktivity patří antioxidační, protizánětlivý, antiproliferativní, antitrombotický, antimikrobiální, kardioprotektivní, antidiabetický, hepatoprotektivní a protinádorový účinek [36, 37, 38]. Bylo zjištěno, že floretin je schopen inhibovat aktivitu jednoho z hojně rozšířených patogenů, a to bakterie *Staphylococcus aureus*. *S. aureus* způsobuje širokou škálu onemocnění, jako je např. mastitida nebo nozokomiální a komunitní pneumonie. Floretin zmírňuje poškození lidských alveolárních epiteliálních buněk způsobené *S. aureus*, snižuje počet bakteriálních kolonií a tlumí zánětlivou reakci [39]. Přítomnost hydroxylových funkčních skupin a karbonylové skupiny v molekule floretinu umožňuje tomuto polyfenolu zachytávat různé reaktivní druhy kyslíku, včetně peroxynitridu, hydroxylový radikál nebo superoxidový anion. Některé práce uvádějí i schopnost floretinu tlumit peroxidaci lipidů [40]. Floretin snižuje výskyt kardiovaskulárních a cerebrovaskulárních onemocnění díky inhibici aktivity krevních destiček. V jablku je navíc obsažená i celá řada dalších látek, jako je např. vláknina nebo vitamin C, které stejně jako floretin pozitivně přispívají k prevenci srdečních onemocnění. Nízké dávky floretinu (15 µg) také způsobují významný pokles prozánětlivých faktorů vznikajících v důsledku zvýšené hladiny kyseliny močové v těle. Floretin jakožto silný antioxidant je schopen společně s dalšími látkami jako je vitamin C nebo kyselina ferulová chránit pokožku před ultrafialovým zářením a zabránit jejímu poškození. Antioxidační účinek floretinu se uplatňuje i v prevenci nádorových onemocnění, stejně jako jeho schopnost

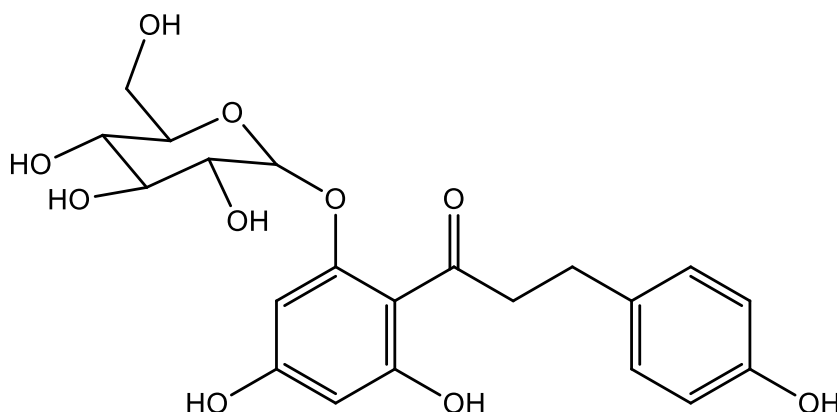
regulovat buněčnou proliferaci, stimulovat cytoprotektivní enzymy a inhibovat cytotoxické systémy. Přítomnost čtyř hydroxylových funkčních skupin v molekule floretinu navíc brání transmembránovému transportu sacharidů, a tím způsobuje apoptózu nádorových buněk [38].



Obrázek 5: Floretin [36]

3.4.4.4 Florizin

Florizin (Obr. 6) je glykosid složený z aglykonu floretinu a glukózy. Florizin se stejně jako floretin nachází v plodech listnatých stromů rodu *Malus* L. a vykazuje i stejné farmakologické vlastnosti. Florizin je schopný kompetitivně inhibovat kotransportér SGLT1 a SGLT2. Inhibice kotransportéru SGLT1 vede ke snížení absorpce glukózy z tenkého střeva, zatímco inhibice kotransportéru SGLT2 má za následek omezení reabsorpce glukózy v ledvinách a zvýšení jejího vylučování močí. Obě tyto schopnosti florizinu se výrazně podílejí na snížení glukózy v krvi. Florizin je v tenkém střevě štěpen laktátovou hydrolázou na floretin a glukózu, proto po perorálním podání může inhibovat pouze kotransportér SGLT1 a nikoliv SGLT2. Inhibici kotransportéru SGLT2 již zajišťuje aglykon floretin [41].

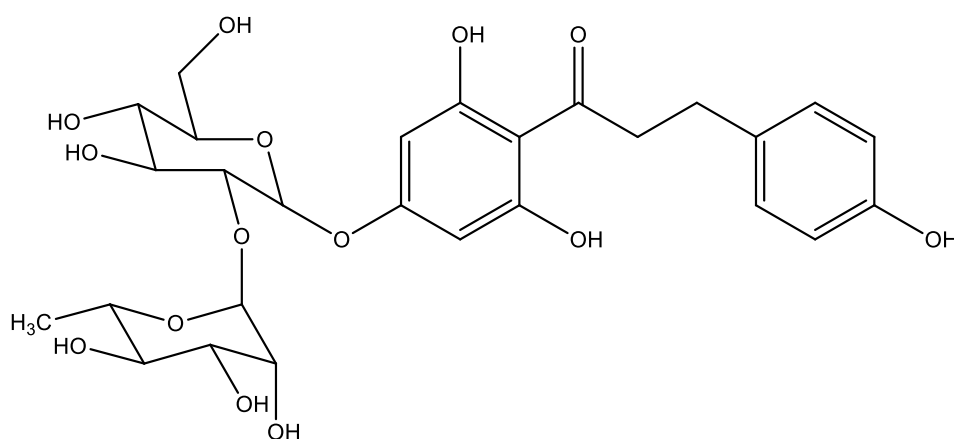


Obrázek 6: Florizin [41]

3.4.4.5 Naringin dihydrochalkon

Naringin dihydrochalkon (naringin DHC, Obr. 7) je látka odvozená z flavonoidu naringinu nacházejícího se v rostlinách jako je např. *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, *Vitis vinifera*

L., *Prunus avium* (L.) L., *Phaseolus vulgaris* L., *Theobroma cacao* L., *Solanum lycopersicum* L. a *Origanum vulgare* L [42, 43]. V roce 1963 byl reakcí naringinu s hydroxidem draselným (alkalickou hydrolyzou) a jeho následnou katalytickou hydrogenací získán naringin dihydrochalkon, který je až 300krát sladší než sacharóza [44]. Tato látka byla objevena díky výzkumnému programu s cílem nalézt metody pro snížení hořké chuti látek obsažených v citrusových šťávách [42, 43]. Po objevení naringinu DHC byl připraven velký počet analogů za účelem stanovit vztah mezi jeho strukturou a sladkou chutí. Nedávné studie těchto analogů provedené v Dynapolu (Palo Alto, Kalifornie) poukázaly na klíčovou strukturní část molekuly naringinu DHC, která je zodpovědná za sladkou chuť. Je jí pravděpodobně aromatické jádro [45]. V dnešní době se naringin DHC používá jako nízkokalorické sladidlo v potravinářském a farmaceutickém průmyslu. V roce 1976 byl zkoumán vliv naringinu DHC a neohesperidinu DHC na růst kariogenních bakterií podílejících se na vzniku zubního kazu. Především byl sledován vliv sladidel na rozvoj kolonií bakterie *Streptococcus mutans*. Naringin DHC při koncentraci 2% působil mírnou inhibicí nebo neměl žádný účinek na kolonie *S. mutans*. Oproti tomu neohesperidin DHC potlačoval růst bakteriálních kolonií v celém rozsahu koncentrací [46]. Naringin DHC také disponuje vysokou antioxidační aktivitou, dokonce vyšší než jeho prekurzor flavanon naringin. Díky schopnosti potlačovat zánět a snižovat hladiny amyloidu beta byl navržen jako látka vhodná k terapii neurodegenerativních onemocnění, např. Alzheimerovy choroby [47].

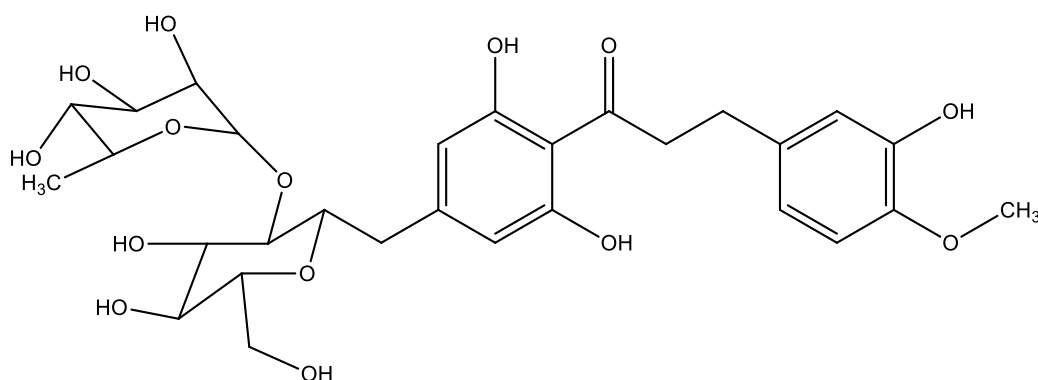


Obrázek 7: Naringin dihydrochalkon [47]

3.4.4.6 Neohesperidin dihydrochalkon

Neohesperidin dihydrochalkon (neohesperidin DHC, Obr. 8) je nízkokalorické sladidlo aktivující lidský receptor pro sladkou chuť TAS1R2 a TAS1R3 [43]. V EU je tato

látkou schváleným sladidlem (E 959) a je asi 1 500 až 1 800krát sladší než sacharóza [48]. Uvádí se, že tato látka chutná po lékořici, je termostabilní a relativně odolná vůči kyselé hydrolýze. Používá se k oslazení nápojů, džemů, jogurtů, žvýkaček, zubních past a léčivých přípravků [44]. Sladkou chuť neohesperidinu DHC objevil v roce 1963 Horwitz a Gentil při studiu fenolických glykosidů. Neohesperidin DHC lze syntetizovat prostřednictvím chemických a enzymatických metod z citrusových flavanonů. Výchozí látkou pro výrobu neohesperidinu DHC je buď neohesperidin, který lze extrahovat z hořkého pomeranče (*Citrus aurantium* L.), nebo naringin, který se získává z grepfruitu (*Citrus paradisi* Macfad.). Syntéza z extrahovaného neohesperidinu zahrnuje hydrogenaci v přítomnosti katalyzátoru za alkalických podmínek. Syntéza z extrahovaného naringinu spočívá v přeměně na floroacetofenon-4'-β-neohesperidosid, který lze kondenzovat s isovanilinem (3-hydroxy-4-methoxybenzaldehydem) za vzniku neohesperidinu DHC. V letech 1985 až 1986 byla provedena studie o subchronické (13týdenní) orální toxicitě neohesperidinu DHC, na základě jejichž i dřívějších výsledků vědecký výbor pro potraviny the Scientific Committee for Food of the European Community uznal neohesperidin DHC toxicky přijatelný [49]. Sladidlo neohesperidin DHC dovede zachycovat volné radikály a u jeho analogů byla dokonce objevena schopnost inhibovat adipogenní diferenciaci u člověka. Analogy neohesperidinu DHC by tedy mohly představovat nové možnosti v terapii obezity [50]. Neohesperidin DHC je také jednou z obsahových složek listů jabloně zakrslé (*Malus pumila* Mill.), které mají protiprůjmové účinky [51].



Obrázek 8: Neohesperidin dihydrochalkon [43]

4 Experimentální část

4.1 Pomůcky

4.1.1 Použitý materiál

- Automatické pipety, různé objemy (Brandt)
- Mikrotitrační destičky (Brandt)
- Špičky k mikropipetám, různé velikosti (Brandt)
- Vícekanálové pipety, různé objemy (Biohit)
- Zkumavky, různé objemy (Brandt)
- Zkumavky 15 ml s uzávěrem (Brandt)

4.1.2 Použité chemikálie

Všechny použité chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich, není-li uvedeno jinak

- Dimethylsulfoxid (DMSO) Lachner $\geq 99,5\%$
- Ferrozin (sodná sůl kyseliny 4,4'-(3-(2-pyridinyl)-1,2,4-triazin-5,6-diyl) bisbenzensulfonové) 97%
- HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin ethansulfonová kyselina) $\geq 99,5\%$
- HEPES sodná sůl $\geq 99,5\%$
- Hydroxylamin hydrochlorid ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$) $\geq 99,5\%$
- Chlorid železitý ($\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$) $\geq 99\%$
- Síran železnatý ($\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$) $\geq 99\%$
- Kyselina octová (CH_3COOH) $\geq 99\%$
- Octan sodný ($\text{CH}_3\text{COO}^-\text{Na}^+$) $\geq 99\%$

4.1.3 Testované látky

- Isoliquiritigenin ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich)
- Likochalkon A ($\geq 96\%$, Merck Germany)
- Naringin dihydrochalkon (čistota neuvedena)
- Neohesperidin dihydrochalkon (98 %, Sigma-Aldrich)
- Floretin ($\geq 97\%$, Merck Germany)
- Florizin ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich)

Vzorce testovaných látek byly vytvořeny v programu ChemDraw Ultra 12.0.

4.1.4 Přístrojové vybavení

- Analytické váhy KERN ABT120-5DM
- Spektrofotometr pro mikrotitrační destičky NEO2MALPHA Synergy 02 (BioTech, Praha)
- Třepačka pro mikrotitrační destičky IKA®MS 3 digital
- Třepačka pro zkumavky IKA®VORTEX GENIUS 3

4.2 Příprava roztoků

- Roztok hydroxylamin hydrochloridu (HA) o koncentraci 100 mM v destilované vodě: 100 mM roztok hydroxylaminu byl připraven rozpuštěním hydroxylaminu ($M_w = 69,49$ g/mol) v destilované vodě za účelem získání koncentrace 100 mM a následně byl roztok zředěn na koncentraci 10 mM.
- Roztok chloridu železitého (železitých iontů Fe^{2+}) o koncentraci 5 mM v destilované vodě: 5 mM roztok byl připraven rozpuštěním $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ($M_w = 270,29$ g/mol) v destilované vodě a následně byl roztok v čas potřeby zředěn na koncentraci 250 μ M. Základní roztok byl uchováván v temnu.
- Roztok síranu železnatého (železnatých iontů Fe^{2+}) o koncentraci 5mM v destilované vodě: 5 mM roztok byl připraven rozpuštěním $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ($M_w = 278,02$ g/mol) v destilované vodě a následně byl roztok zředěn na koncentraci 250 μ M.
- Roztok ferrozinu o koncentraci 5 mM: 5 mM roztok byl připraven rozpuštěním ferrozinu ($M_w = 492,5$ g/mol) v destilované vodě.
- Roztoky testovaných látek v DMSO o různých koncentracích: Roztoky chalkonů byly připraveny rozpuštěním jednotlivých zkoušených látek v DMSO.

4.3 Standardní operační postupy

4.3.1 Kontrola připraveného základního roztoku železnatých iontů

Zkouška byla provedena vždy u nově připraveného 5mM základního roztoku železnatých iontů, za účelem důkazu správnosti přípravy a kontroly obsahu Fe^{2+} . Do dvou jamek mikrotitrační destičky bylo napipetováno 100 μ l DMSO, 50 μ l Fe^{2+} 250 μ M a 50 μ l ferrozinu 5 mM. Po napipetování byla ihned změřena absorbance při vlnové délce 562 nm. Základní roztok železnatých iontů zkoušce vyhovuje, pohybují-li se naměřené hodnoty absorbance kolem hodnoty 1,0. Vyhovující roztok je možné použít pro měření.

4.3.2 Kontrola připraveného základního roztoku železitých iontů

Zkouška byla provedena vždy u nově připraveného 5 mM základního roztoku železitých iontů, za účelem důkazu správnosti přípravy a kontroly obsahu Fe^{3+} . Do dvou jamek mikrotitrační destičky bylo napipetováno 150 μl pufru o pH 4,5, 50 μl DMSO, 50 μl Fe^{3+} 250 μM , 50 μl hydroxylaminu 10 mM a 50 μl ferrozinu 5 mM. Po napipetování byla ihned změřena absorbance při vlnové délce 562 nm. Základní roztok železitých iontů zkoušce vyhovuje, pohybují-li se naměřené hodnoty absorbance kolem hodnoty 1,0. Vyhovující roztok je možné použít pro měření.

4.3.3 Kalibrační křivka

Pro zhodnocení naměřených výsledků je nezbytné vytvořit kalibrační křivku závislosti absorbance na koncentraci železnatých iontů. Ze zásobního roztoku $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 mM byly připraveny roztoky o koncentracích: 75 μM , 150 μM , 250 μM , 500 μM a 700 μM . Do jamek mikrotitrační destičky bylo napipetováno 150 μl destilované vody a 50 μl roztoku železnatých iontů o zadané koncentraci nebo 50 μl destilované vody. Na závěr bylo přidáno do poloviny jamek 50 μl ferrozinu 5 mM nebo 50 μl destilované vody. Po napipetování byla ihned změřena absorbance při vlnové délce 562 nm. Z naměřených hodnot byl sestaven graf závislosti absorbance na koncentraci železnatých iontů.

	$c(\text{Fe}^{2+}) = 0$ μM	$c(\text{Fe}^{2+}) =$ 75 μM	$c(\text{Fe}^{2+}) =$ 150 μM	$c(\text{Fe}^{2+}) =$ 250 μM	$c(\text{Fe}^{2+}) =$ 500 μM	$c(\text{Fe}^{2+}) =$ 750 μM
ferrozin (indikátor)						
slepé vzorky						

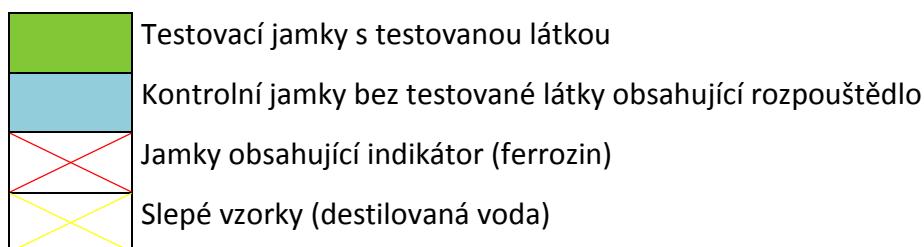
	Testovací jamky s rozdílnou koncentrací Fe^{2+}
	Kontrolní jamky bez Fe^{2+} , destilovaná voda
	Jamky obsahující indikátor (ferrozin)
	Slepé vzorky, destilovaná voda

Obrázek 9: Schéma mikrotitrační destičky kalibrační křivky

4.3.4 Chelatace železnatých iontů v pufru o pH 4,5; 5,5 a 6,8

- 1) Nejdříve byly připraveny roztoky reagentů (0,25mM roztok železnatých iontů a 5mM roztok ferrozinu) a roztoky testovaných látek (10mM roztok testované látky v DMSO, další ředění bylo provedeno dle potřeby).
- 2) V dalším kroku bylo do všech určených jamek mikrotitrační destičky napipetováno 150 μ l pufru.
- 3) Dále bylo napipetováno 50 μ l testované látky o příslušné koncentraci do testovacích jamek nebo 50 μ l rozpouštědla (DMSO) do jamek kontrolních (Obr.10).
- 4) Následně bylo do všech jamek mikrotitrační destičky přidáno 50 μ l pracovního roztoku železnatých iontů (0,25mM roztok Fe^{2+}).
- 5) Mikrotitrační destička byla na dvě minuty vložena na třepačku.
- 6) Nakonec bylo do testovacích jamek přidáno 50 μ l roztoku ferrozinu a do slepých jamek 50 μ l destilované vody. Pro jednotlivé koncentrace testovaných látek byly použity čtyři jamky, z nichž dvě byly testovací a obsahovaly chelátor (5mM roztok ferrozinu) a dvě byly slepé s destilovanou vodou.
- 7) Ihned po přidání ferrozinu byla změřena absorbance při vlnové délce 562 nm.
- 8) Absorbance byla změřena opět po pěti minutách pro zjištění stability komplexů.

	Roztok testované látky c_1	Roztok testované látky c_2	Roztok testované látky c_3	Roztok testované látky c_x	Kontrolní jamky ($c = 0$)
ferrozin (indikátor)	X	X	X	X	X
slepé vzorky	X	X	X	X	X



Obrázek 10: Schéma mikrotitrační destičky při stanovení chelatace Fe^{2+} v pufru o pH 4,5; 5,5 a 6,8

Konečný obsah jamky:

- 150 μ l pufru
- 50 μ l testované látky nebo rozpouštědla (DMSO)
- 50 μ l 0,25mM roztoku železnatých iontů
- 50 μ l 5mM roztoku ferrozinu nebo destilované vody

4.3.5 Chelatace železnatých iontů v pufru o pH 7,5

- 1) Nejdříve byly připraveny roztoky reagensů (0,25mM roztok železnatých iontů, 5mM roztok ferrozinu a 10mM roztok hydroxylaminu hydrochloridu) a roztoky testovaných látek (10mM roztok testované látky v DMSO, další ředění bylo provedeno dle potřeby).
- 2) V dalším kroku bylo do všech určených jamek mikrotitrační destičky napipetováno 150 μ l pufru.
- 9) Dále bylo napipetováno 50 μ l testované látky o příslušné koncentraci do testovacích jamek nebo 50 μ l rozpouštědla (DMSO) do jamek kontrolních (Obr. 11).
- 3) Dále bylo do všech jamek napipetováno 50 μ l 10mM roztoku hydroxylaminu hydrochloridu (HA).
- 4) Následně bylo do všech jamek mikrotitrační destičky přidáno 50 μ l pracovního roztoku železnatých iontů (0,25mM roztok Fe^{2+}).
- 5) Mikrotitrační destička byla na dvě minuty vložena na třepačku.
- 6) Nakonec bylo do testovacích jamek přidáno 50 μ l roztoku ferrozinu a do slepých jamek 50 μ l destilované vody. Pro jednotlivé koncentrace testovaných látek byly použity čtyři jamky, z nichž dvě byly testovací a obsahovaly chelátor (5mM zásobní roztok ferrozinu) a dvě byly slepé s destilovanou vodou.
- 7) Ihned po přidání ferrozinu byla změřena absorbance při vlnové délce 562 nm.
- 8) Absorbance byla změřena opět po pěti minutách pro zjištění stability komplexů.

	Roztok testované látky c_1	Roztok testované látky c_2	Roztok testované látky c_3	Roztok testované látky c_x	Kontrolní jamky ($c = 0$)
ferrozin (indikátor)	X	X	X	X	X
slepé vzorky	X	X	X	X	X

	Testovací jamky s testovanou látkou
	Kontrolní jamky bez testované látky obsahující rozpouštědlo
X	Jamky obsahující indikátor (ferrozin)
X	Slepé vzorky (destilovaná voda)

Obrázek 11: Schéma mikrotitrační destičky při stanovení chelatace Fe^{2+} v pufru o pH 7,5

Konečný obsah jamky:

- 150 μ l pufru
- 50 μ l testované látky nebo rozpouštědla (DMSO)
- 50 μ l 10mM roztoku hydroxylaminu hydrochloridu (HA)
- 50 μ l 0,25mM roztoku železnatých iontů
- 50 μ l 5mM roztoku ferrozinu nebo destilované vody

4.3.6 Chelatace železitých iontů v pufru o pH 4,5

- 1) Nejdříve byly připraveny roztoky reagentů (0,25mM roztok železitých iontů, 5mM roztok ferrozinu a 10mM roztok hydroxylaminu hydrochloridu) a roztoky testovaných látek (10mM roztok testované látky v DMSO, další ředění bylo provedeno dle potřeby).
- 2) V dalším kroku do všech jamek mikrotitrační destičky bylo napipetováno 150 μ l pufru o pH 4,5.
- 3) Dále bylo napipetováno 50 μ l testované látky o příslušné koncentraci do testovacích jamek nebo 50 μ l rozpouštědla (DMSO) do jamek kontrolních (Obr. 12).
- 4) Dále byl připraven čerstvý 0,25mM roztok železitých iontů z 5mM roztoku železitých iontů.

- 5) Následně bylo do všech jamek mikrotitrační destičky přidáno 50 μl čerstvého pracovního roztoku železitých iontů (0,25mM roztok Fe^{3+}).
- 6) Mikrotitrační destička byla na dvě minuty vložena na třepačku.
- 7) V dalším kroku do všech jamek mikrotitrační destičky přidáme 50 μl 10mM roztoku hydroxylaminu hydrochloridu (HA).
- 8) Mikrotitrační destička byla na jednu minutu vložena na třepačku.
- 9) Nakonec bylo do testovacích jamek přidáno 50 μl roztoku ferrozinu a do slepých jamek 50 μl destilované vody. Pro jednotlivé koncentrace testovaných látek byly použity čtyři jamky, z nichž dvě byly testovací a obsahovaly chelátor (5mM roztok ferrozinu) a dvě byly slepé s destilovanou vodou.
- 10) Ihned po přidání ferrozinu byla změřena absorbance při vlnové délce 562 nm.
- 11) Absorbance byla změřena opět po pěti minutách pro zjištění stability komplexů.

	Roztok testované látky c_1	Roztok testované látky c_2	Roztok testované látky c_3	Roztok testované látky c_x	Kontrolní jamky ($c = 0$)
ferrozin	X	X	X	X	X
(indikátor)	X	X	X	X	X
slepé vzorky	X	X	X	X	X

	Testovací jamky s testovanou látkou
	Kontrolní jamky bez testované látky obsahující rozpouštědlo
X	Jamky obsahující indikátor (ferrozin)
X	Slepé vzorky (destilovaná voda)

Obrázek 12: Schéma mikrotitrační destičky při stanovení chelatace Fe^{3+} v pufru o pH 4,5

Konečný obsah jamky:

- 150 μl pufru
- 50 μl testované látky nebo rozpouštědla (DMSO)
- 50 μl 0,25mM roztoku železitých iontů
- 50 μl 10mM roztoku hydroxylaminu hydrochloridu (HA)
- 50 μl 5mM roztoku ferrozinu nebo destilované vody

4.3.7 Chelatace železitých iontů v DMSO

- 1) Nejdříve byly připraveny roztoky reagensů (0,25mM roztok železitých iontů, 5mM roztok ferrozinu a 10mM roztok hydroxylaminu hydrochloridu) a roztoky testovaných látek (10mM roztok testované látky v DMSO, další ředění bylo provedeno dle potřeby).
- 2) Dále bylo napipetováno 100 μ l testované látky o příslušné koncentraci do testovacích jamek nebo 100 μ l rozpouštědla (DMSO) do jamek kontrolních (Obr. 13).
- 3) Dále byl připraven čerstvý 0,25mM roztok železitých iontů z 5mM roztoku železitých iontů.
- 4) Následně bylo do všech jamek mikrotitrační destičky přidáno 50 μ l čerstvého pracovního roztoku železitých iontů (0,25mM roztok Fe^{3+}).
- 5) Mikrotitrační destička byla na dvě minuty vložena na třepačku.
- 6) V dalším kroku do všech jamek mikrotitrační destičky přidáme 50 μ l 10mM roztoku hydroxylaminu hydrochloridu (HA).
- 7) Mikrotitrační destička byla na jednu minutu vložena na třepačku.
- 8) Nakonec bylo do testovacích jamek přidáno 50 μ l roztoku ferrozinu a do slepých jamek 50 μ l destilované vody. Pro jednotlivé koncentrace testovaných látek byly použity čtyři jamky, z nichž dvě byly testovací a obsahovaly chelátor (5mM zásobní roztok ferrozinu) a dvě byly slepé s destilovanou vodou.
- 9) Ihned po přidání ferrozinu byla změřena absorbance při vlnové délce 562 nm.
- 10) Absorbance byla změřena opět po pěti minutách pro zjištění stability komplexů.

	Roztok testované látky c ₁	Roztok testované látky c ₂	Roztok testované látky c ₃	Roztok testované látky c _x	Kontrolní jamky (c = 0)
ferrozin (indikátor)	X	X	X	X	X
slepé vzorky	X	X	X	X	X

	Testovací jamky s testovanou látkou
	Kontrolní jamky bez testované látky obsahující rozpouštědlo
X	Jamky obsahující indikátor (ferrozin)
X	Slepé vzorky (destilovaná voda)

Obrázek 13: Schéma mikrotitrační destičky při stanovení chelatace Fe^{3+} v DMSO

Konečný obsah jamky:

- 100 μ l testované látky nebo rozpouštědla (DMSO)
- 50 μ l 0,25mM roztoku železitých iontů
- 50 μ l 10mM roztoku hydroxylaminu hydrochloridu (HA)
- 50 μ l 5mM roztoku ferrozinu nebo destilované vody

4.3.8 Redukce železitých iontů v pufru o pH 4,5; 5,5; 6,5 a 7,5

- 1) Nejdříve byly připraveny roztoky reagensů (0,25mM roztok železitých iontů, 5mM roztok ferrozinu a 10mM roztok hydroxylaminu hydrochloridu) a roztoky testovaných látek (10mM roztok testované látky v DMSO, další ředění bylo provedeno dle potřeby).
- 2) V dalším kroku bylo napipetováno 150 μ l pufru do všech testovacích jamek a 150 μ l pufru o pH 4,5 do kontrolních jamek (Obr. 14).
- 3) Dále bylo napipetováno 50 μ l testované látky o příslušné koncentraci do testovacích jamek nebo 50 μ l hydroxylaminu hydrochloridu do kontrolních jamek.
- 4) Následně byl připraven čerstvý 0,25mM roztok železitých iontů z 5mM roztoku železitých iontů.
- 5) Dále bylo do všech jamek mikrotitrační destičky přidáno 50 μ l čerstvého pracovního roztoku železitých iontů (0,25mM roztok Fe^{3+}).

- 6) Mikrotitrační destička byla na dvě minuty vložena na třepačku.
- 7) Nakonec bylo do testovacích jamek přidáno 50 μl roztoku ferrozinu a do slepých jamek 50 μl destilované vody. Pro jednotlivé koncentrace testovaných látek byly použity čtyři jamky, z nichž dvě byly testovací a obsahovaly chelátor (5mM roztok ferrozinu) a dvě byly slepé s destilovanou vodou.
- 8) Ihned po přidání ferrozinu byla změřena absorbance při vlnové délce 562 nm.
- 9) Absorbance byla změřena opět po pěti minutách pro zjištění stability komplexů.

	Roztok testované látky c_1	Roztok testované látky c_2	Roztok testované látky c_3	Roztok testované látky $c = 0$ mM	Kontrolní jamky (HA)
ferrozin (indikátor)	X	X	X	X	X
slepé vzorky	X	X	X	X	X

	Jamky s testovanou látkou
	Kontrolní jamky s HA
X	Jamky obsahující indikátor (ferrozin)
X	Slepé vzorky, destilovaná voda

Obrázek 14: Schéma mikrotitrační destičky při stanovení redukce Fe^{3+} v pufru o pH 4,5; 5,5;

6,5 a 7,5

Konečný obsah jamky:

- 150 μl pufru
- 50 μl testované látky nebo 50 μl 10mM roztoku hydroxylaminu hydrochloridu (HA)
- 50 μl 0,25mM roztoku železitých iontů
- 50 μl 5mM roztoku ferrozinu nebo destilované vody

4.3.9 Redukce železitých iontů v DMSO

- 1) Nejdříve byly připraveny roztoky reagensů (0,25mM roztok železitých iontů, 5mM roztok ferrozinu a 10mM roztok hydroxylaminu hydrochloridu) a pracovní roztoky (10mM roztok testované látky v DMSO, další ředění bylo provedeno dle potřeby).

- 2) V dalším kroku bylo napipetováno 100 μl testované látky o příslušné koncentraci do testovacích jamek nebo 100 μl 10mM roztoku hydroxylaminu hydrochloridu do jamek kontrolních (Obr. 15).
- 3) Následně byl připraven čerstvý 0,25mM roztok železitých iontů z 5mM roztoku železitých iontů.
- 4) Následně bylo do všech jamek mikrotitrační destičky přidáno 50 μl čerstvého pracovního roztoku železitých iontů (0,25mM roztok Fe^{3+}).
- 5) Mikrotitrační destička byla na dvě minuty vložena na třepačku.
- 6) Nakonec bylo do testovacích jamek přidáno 50 μl roztoku ferrozinu a do slepých jamek 50 μl destilované vody. Pro jednotlivé koncentrace testovaných látek byly použity čtyři jamky, z nichž dvě byly testovací a obsahovaly chelátor (5mM roztok ferrozinu) a dvě byly slepé s destilovanou vodou.
- 7) Ihned po přidání ferrozinu byla změřena absorbance při vlnové délce 562 nm.
- 8) Absorbance byla změřena opět po pěti minutách pro zjištění stability komplexů.

	Roztok testované látky c_1	Roztok testované látky c_2	Roztok testované látky c_3	Roztok testované látky $c = 0$ mM	Kontrolní jamky (HA)
ferrozin (indikátor)	X	X	X	X	X
slepé vzorky	X	X	X	X	X

	Jamky s testovanou látkou
	Kontrolní jamky s HA
X	Jamky obsahující indikátor (ferrozin)
X	Slepé vzorky, destilovaná voda

Obrázek 15: Schéma mikrotitrační destičky při stanovení redukce Fe^{3+} v DMSO

Kontrolní jamky:

- 100 μl testované látky nebo 100 μl 10mM roztoku hydroxylaminu hydrochloridu (HA)
- 50 μl 0,25mM roztoku železitých iontů

- 50 µl 5mM roztoku ferrozinu nebo destilované vody

4.4 Statistická analýza

Množství nevázaného (nechelatovaného) železa bylo stanoveno následujícím způsobem:

- 1) Nejprve byl vypočítán rozdíl absorbancí mezi testovací jamkou (testovaná látka + indikátor ferrozín) a slepým vzorkem (testovaná látka bez indikátoru).
- 2) Následně byl vypočítán rozdíl absorbancí kontrolního vzorku a jeho slepého vzorku.
- 3) Výsledek bodu 1) byl vydělen výsledkem bodu 2), čímž bylo zjištěno množství nechelatovaného železa. Tato hodnota byla odečtena od 100 %, čímž bylo stanoveno, kolik železa bylo chelatováno.

Množství redukováného železa bylo zjištěno obdobným výpočtem. Hodnoty však byly na rozdíl od výše uvedeného postupu děleny rozdílem absorbancí hydroxylaminu hydrochloridu, tudíž nebylo nutné pro zjištění výsledného množství redukováného železa odečítat od 100 %.

K vytvoření statistické analýzy železo-chelatační aktivity testovaných látek byl použit program MS Excel a GraphPad Prism verze 8 pro Windows (GraphPad Software, USA). Výsledky byly vyhodnoceny jako průměr \pm směrodatná odchylka vypočítaná podle vzorce

$$\sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n}}$$

K vytvoření statistické analýzy železo-redukující aktivity testovaných látek byl použit program MS Excel. Analýza byla provedena pomocí t-testu, kdy byly hodnoty porovnávány s negativní kontrolou (rozpuštědlo).

Míra účinnosti jednotlivých testovaných látek byla stanovena porovnáním 95% konfidenčních (predikčních) intervalů chelatačních křivek a porovnáním přímek lineární regrese v případě redukční aktivity látek.

Všechny grafy, uvedené v práci, byly vytvořeny v programu GraphPad Prism verze 8 pro Windows.

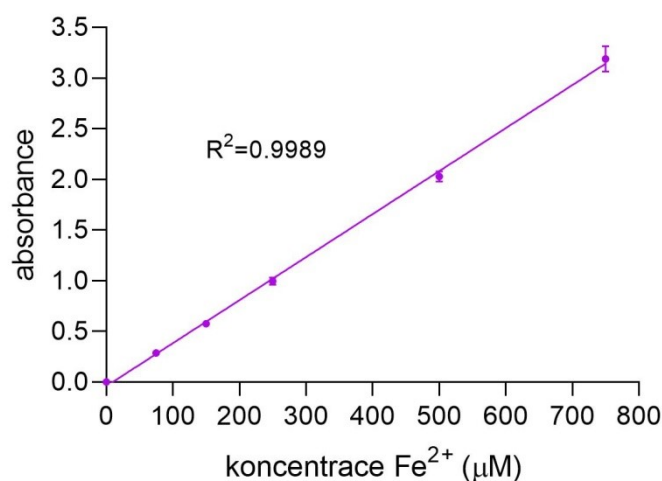
5 Výsledky

5.1 Kalibrační křivka

Z naměřených hodnot absorbancí (Tab. 1) byl sestrojen graf kalibrační křivky, neboli graf závislosti absorbance na koncentraci železnatých iontů (Obr. 16). Pro sestrojení grafu byly použity tyto koncentrace železnatých iontů: 75 μM , 150 μM , 250 μM , 500 μM a 750 μM . Graf kalibrační křivky vykazuje lineární závislost absorbance na koncentraci železnatých iontů, z toho vyplývá, že při rostoucí koncentraci železnatých iontů ve vzorku roste i hodnota naměřené absorbance. Lineární závislost absorbance na množství chelatovaných Fe^{2+} iontů byla ověřena naměřením kalibrační křivky s vysokou hodnotou spolehlivosti ($R^2 = 0,9989$).

Tabulka 1: Naměřené hodnoty absorbancí

Koncentrace Fe^{2+} (μM)	0	75	150	250	500	750
Průměrná absorbance 562 nm	0,036	0,323	0,614	1,034	2,064	3,234



Obrázek 16: Kalibrační křivka

5.2 Chelatační účinky testovaných látek

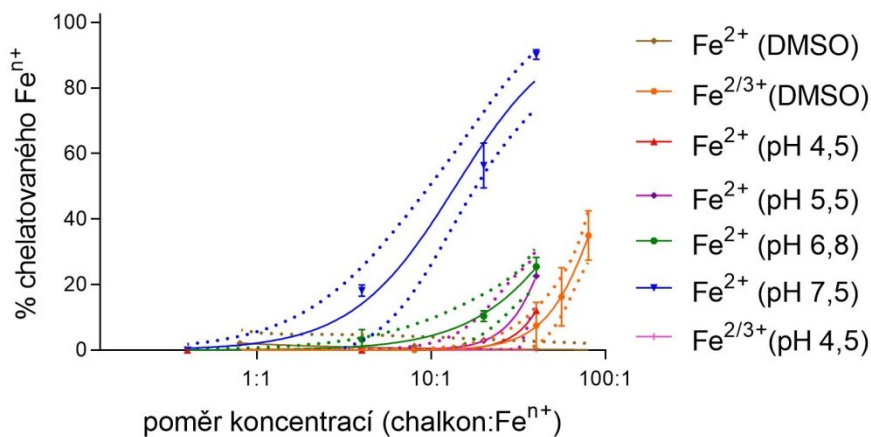
Chelatační účinky chalkonů byly stanoveny metodou mikrotitrace. Měření probíhalo v prostředí DMSO a pufrů o pH: 4,5; 5,5; 6,8 a 7,5. Jako indikátor byla použita komplexotvorná látka ferrozín, který interagoval s nespotřebovanými železnatými ionty za

vzniku barevného komplexu. Jelikož indikátor vytváří komplexy pouze s ionty Fe^{2+} bylo v prostředí pufru o pH 7,5 z důvodu vysokého rizika oxidace železnatých iontů na železité přidáno redukční činidlo hydroxylamin hydrochlorid (HA). Železo-chelatační aktivita byla stanovena spektrofotometricky při 562 nm, kdy komplex ferrozín- Fe^{2+} vykazuje maximální absorpci. Absorbance byla měřena ihned po přidání indikátoru, a poté znovu po pěti minutách, kvůli riziku uvolnění železnatých iontů z komplexů. Čím vyšší byla naměřená hodnota absorbance, tím vyšší byla koncentrace barevného komplexu ferrozín- Fe^{2+} ve vzorku. Nízké množství komplexu ferrozín- Fe^{2+} ve vzorku naznačovalo, vysokou schopnost testované látky chelátovat železnaté ionty a naopak.

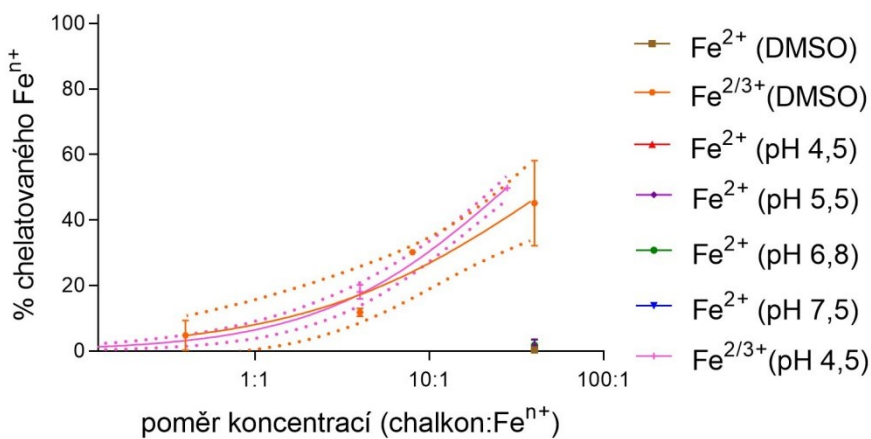
Železo-chelatační aktivitu vzhledem k Fe^{2+} iontům vykazovalo pět ze šesti testovaných látek. Nejvyšší železo-chelatační účinek byl objeven u isoliquiritigeninu, který chelatoval 90 % iontů Fe^{2+} v poměru 100:1 při pH 7,5 (Obr. 17). Železo-chelatační aktivita testovaných látek byla podstatně vyšší v prostředí o vyšším pH (7,5; 6,8) než v prostředí s nízkým pH (5,5; 4,5). Tento jev pravděpodobně souvisí s větší ochotou hydroxylové skupiny sdílet volný elektronový pár při vyšším pH.

Testována byla i schopnost chalkonů vázat ionty Fe^{3+} v prostředí o pH 4,5 a v DMSO. Železité ionty musely být při měření z důvodu použití ferrozínu, jakožto indikátoru, redukovány za pomoci roztoku hydroxylaminu hydrochloridu (HA). Největší schopnost chelátovat železité ionty byla zjištěna u likochalkonu A, který vázal 40 % iontů $\text{Fe}^{2/3+}$ v prostředí DMSO v poměru nižším než 100:1, jelikož tento poměr vedl ke vzniku sraženiny (Obr. 18). Schopnost testovaných látek vázat železité ionty byla významně nižší než jejich schopnost chelátovat železnaté ionty.

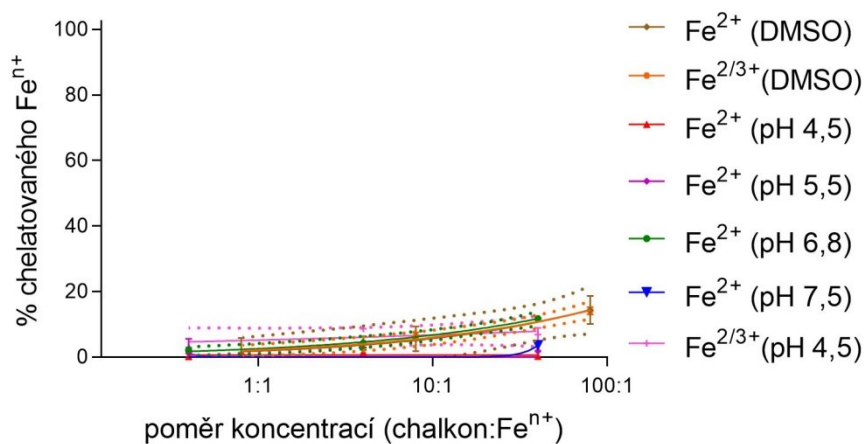
Z naměřených hodnot železo-chelatační aktivity testovaných látek byly sestrojeny grafy (Obr. 17–22), kde jsou znázorněny hodnoty naměřené v čase 5 minut.



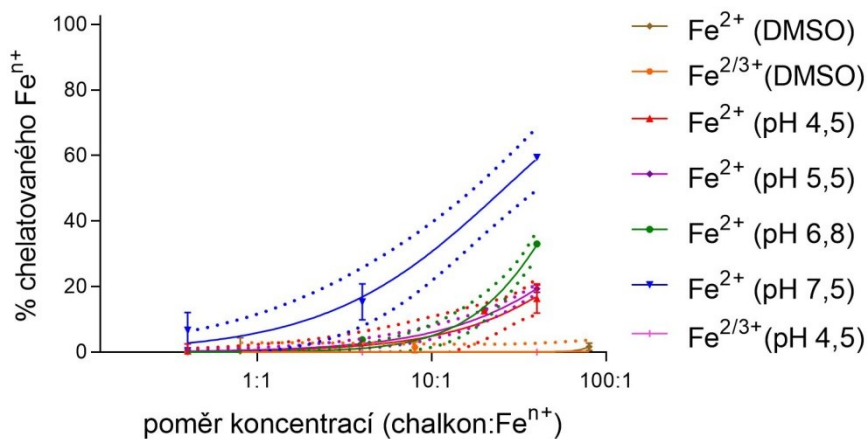
Obrázek 17: Železo-chelatační aktivita isoliquiritigeninu



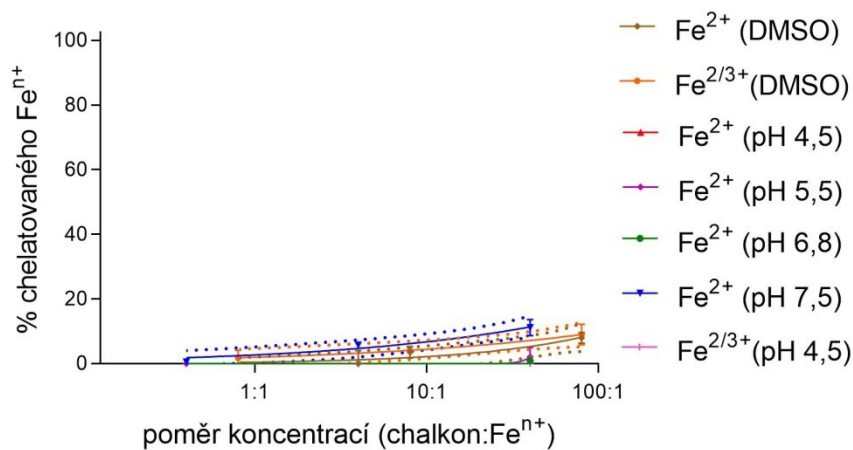
Obrázek 18: Železo-chelatační aktivita likochalkonu A



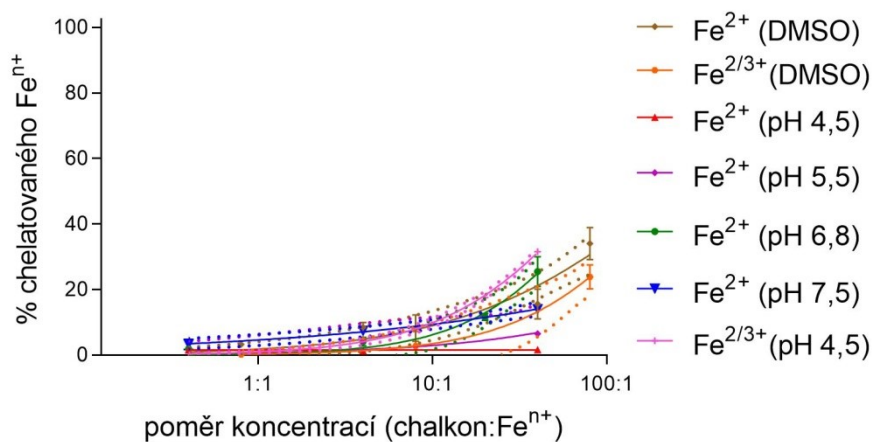
Obrázek 19: Železo-chelatační aktivita floretinu



Obrázek 20: Železo-chelatační aktivita florizinu



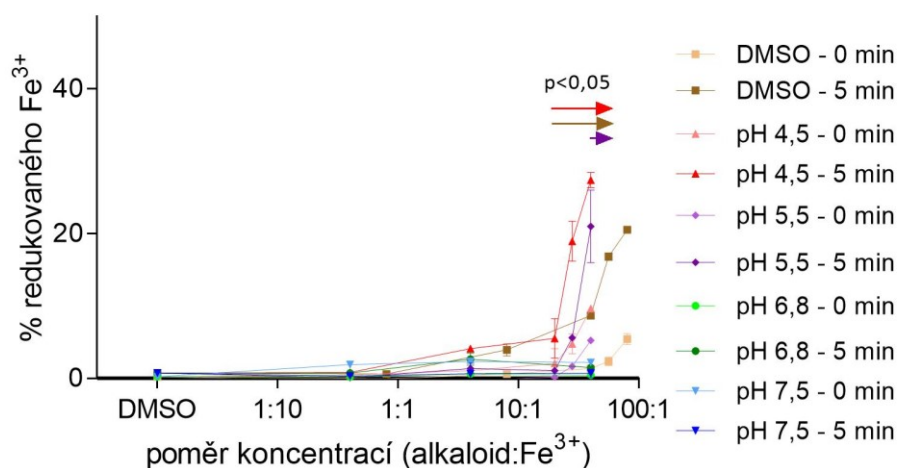
Obrázek 21: Železo-chelatační aktivita naringinu dihydrochalkonu



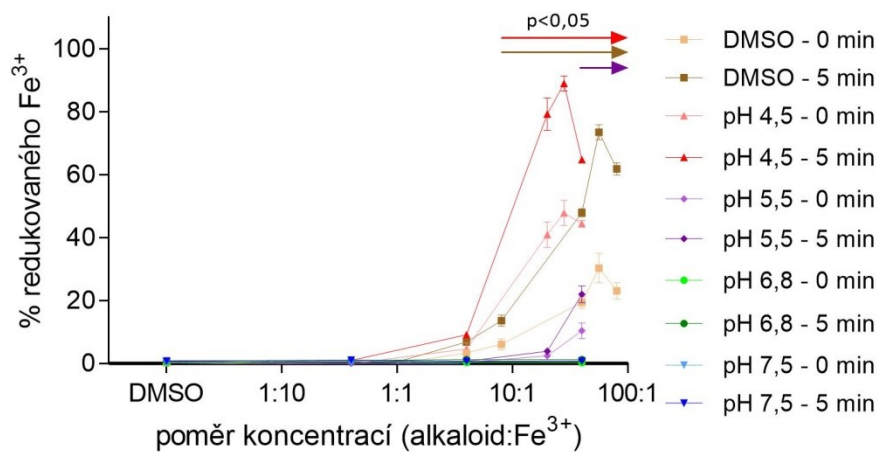
Obrázek 22: Železo-chelatační aktivita neohesperidinu dihydrochalkonu

5.3 Redukční účinky testovaných látek

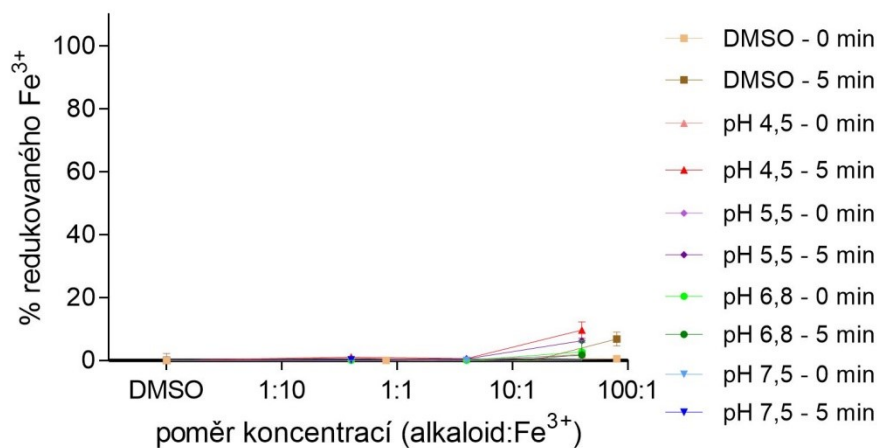
Železo-redukující účinky byly stejně jako železo-chelatační účinky stanoveny spektrofotometricky, za pomoci indikátoru ferrozinu. Měření probíhalo v prostředí DMSO a pufrů o pH: 4,5; 5,5; 6,8 a 7,5. Absorbance byla měřena ihned po přidání indikátoru, a poté znovu po pěti minutách. Vysoká koncentrace barevného komplexu ferrozín- Fe^{2+} ve vzorku signalizovala vysokou schopnost testované látky redukovat železité ionty a naopak. Železo-redukující aktivitu vykazovaly čtyři testované látky, a to: floretin, florizin, naringin dihydrochalkon a neohesperidin dihydrochalkon. Z naměřených hodnot železo-redukující aktivity testovaných látek byly sestrojeny grafy (Obr. 23–26). Šipky znázorňují hodnoty, které se významně ($p < 0,05$) liší od negativní kontroly (rozpuštědlo). Z grafů (Obr. 23–26) vyplývá, že redukce železa je závislá na čase, proto množství zredukovaných iontů železa bylo vyšší při měření po pěti minutách než na začátku měření. Nejvyšší železo-redukující aktivitu vykazoval florizin, který zredukoval 90 % iontů Fe^{3+} v poměru 10:1 při pH 4,5 (Obr. 24).



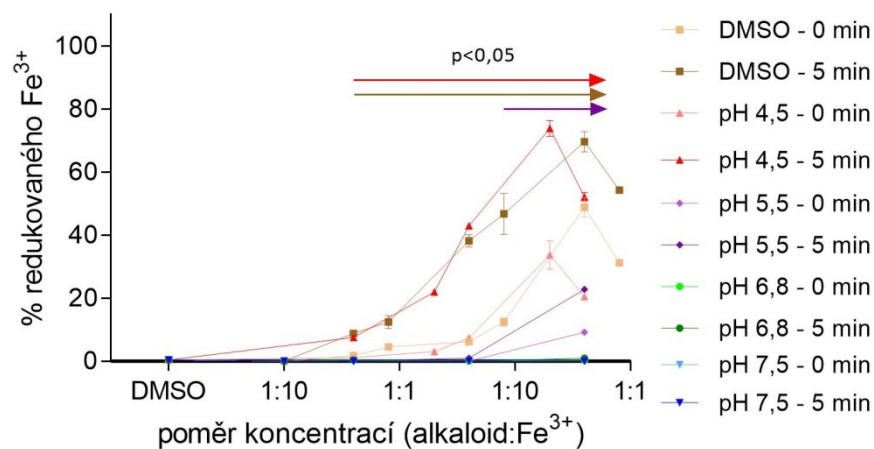
Obrázek 23: Železo-redukující aktivita floretinu



Obrázek 24: Železo-redukující aktivita florizinu



Obrázek 25: Železo-redukující aktivita naringinu dihydrochalkonu

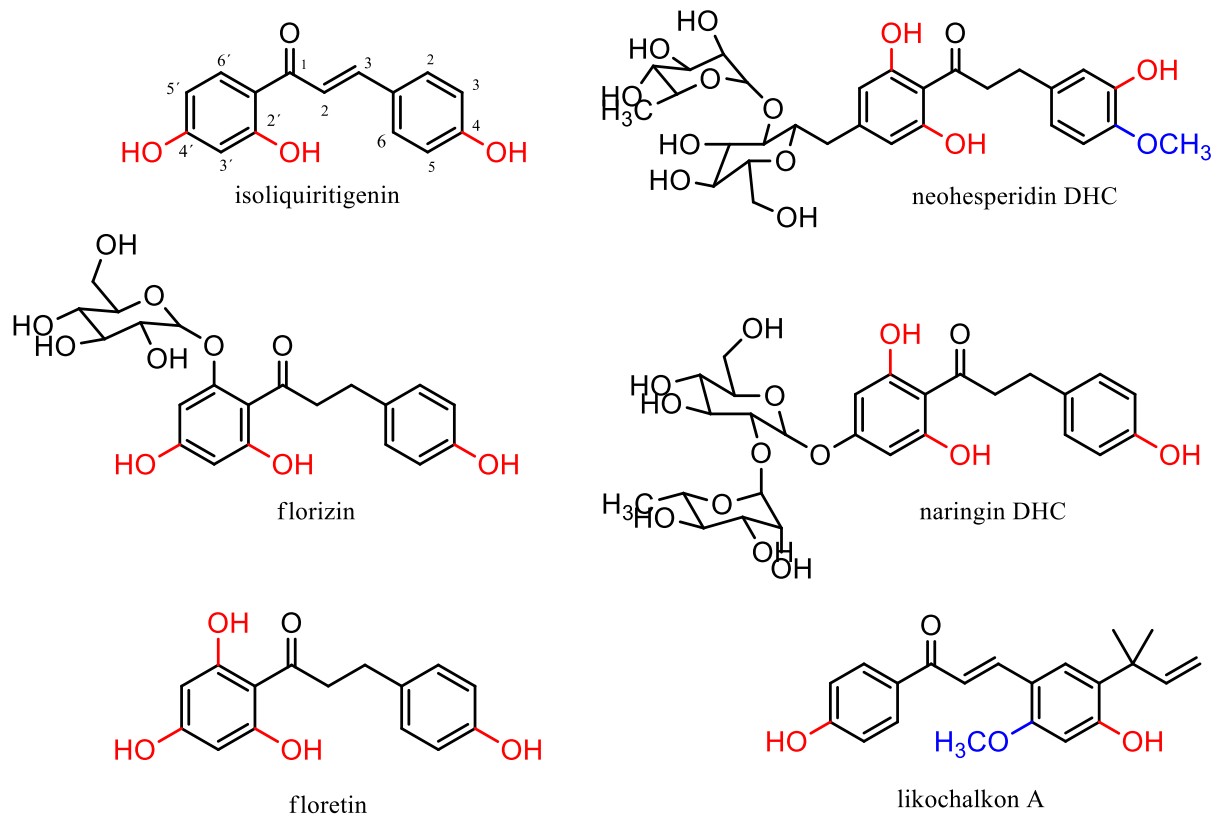


Obrázek 26: Železo-redukující aktivita neohesperidinu dihydrochalkonu

6 Diskuze

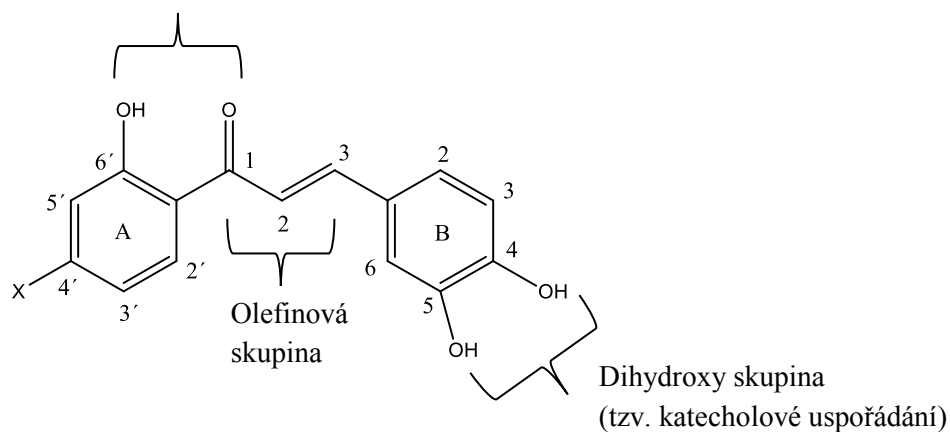
Chalkony jsou přírodní fenolické látky patřící mezi sekundární metabolity rostlin. Obsahují nenasyčený ketonový systém a vykazují široké spektrum biologických aktivit. V této diplomové práci byly zkoumány železo-chelatační a železo-redukující účinky některých vybraných chalkonů v DMSO a prostředí o různých pH (4,5; 5,5; 6,8 a 7,5). Mezi testované látky použité pro vypracování této diplomové práce patří: isoliquiritigenin, floretin, florizin, likochalkon A, naringin dihydrochalkon a neohesperidin dihydrochalkon, které se liší různými substituenty na aromatických kruzích (Obr. 27). Detekce byla provedena spektrofotometricky při 562 nm, za pomoci indikátoru (ferrozin). Absorbance byla měřena ihned po přidání indikátoru, a poté znovu po pěti minutách. Schopnost testovaných látek vázat železité a železnaté ionty se projevila u všech testovaných látek (isoliquiritigenin, likochalkon A, floretin, florizin, naringin DHC, neohesperidin DHC). Železo-chelatační aktivitu jednotlivých testovaných látek jsme vyjádřili prostřednictvím množství chelatovaných iontů železa v procentech a poměrem množství testované látky k iontům železa. Respektive počtem molekul chelátoru (testované látky) nutných k navázání jediného iontu železa.

Z naměřených hodnot lze odvodit vliv struktury testovaných látek na míru železo-chelatační a železo-redukující aktivity. Existují tři hlavní domény chalkonů pro interakci s kovy (Obr. 28): funkční skupiny umístěné na kruhu A a B (-OH, -OR), keto(-enolová) skupina a olefinová skupina [20]. Součástí struktury všech testovaných látek je hydroxylová skupina (-OH) připojená na benzenové jádro, která je klíčová pro vznik koordinačně kovalentní vazby. Hydroxylová skupina vystupuje jako donor volného elektronového páru, zatímco kationty přechodného kovu (Fe^{2+} , Fe^{3+}) s volnými d-orbitaly zaujímají roly příjemce elektronů [52]. Pět ze šesti testovaných látek (Obr. 27) ve své struktuře obsahuje nejméně tři hydroxylové funkční skupiny navázané na aromatické jádro (isoliquiritigenin, floretin, florizin, naringin DHC a neohesperidin DHC). Likochalkon A a neohesperidin dihydrochalkon navíc kromě hydroxylové skupiny obsahují i methoxylovou skupinu (Obr. 27), která je rovněž schopna poskytovat volný elektronový pár [24].



Obrázek 27: Testované látky (červeně – hydroxylová skupina, modře – methoxylová skupina)

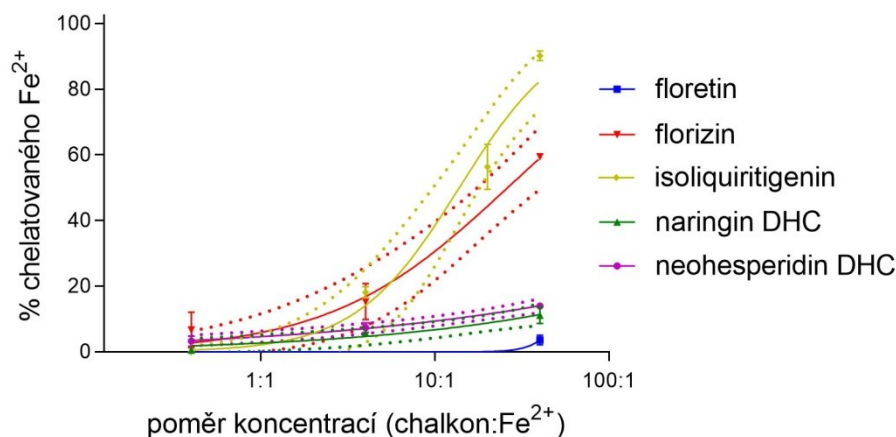
Keto(-enolová) skupina



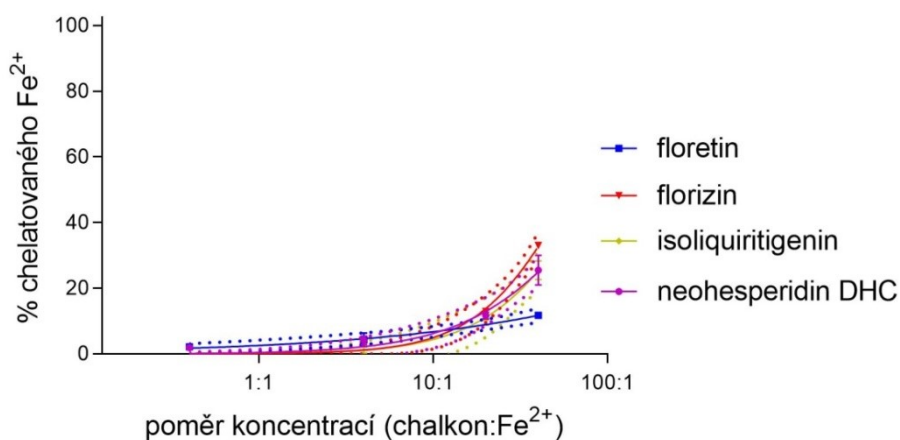
Obrázek 28: Tři hlavní domény chalkonů pro interakci s kovy [20]

Nejvyšší železo-chelatační aktivitu testovaných látek vzhledem k železnatým iontům při pH 7,5 jsme detekovali u isoliquiritigeninu a florizinu (Obr. 29). V prostředí o pH 6,8 nejsou v železo-chelatační aktivitě testovaných látek statisticky významné rozdíly (Obr. 30). V prostředí s nižším pH a v DMSO látky neprojevily téměř žádnou schopnost chelatovat ionty železa. Isoliquiritigenin i florizin mají -OH skupinu lokalizovanou v poloze 2' a 4' na

aromatickém jádře A. Florizin pravděpodobně disponoval mírně nižší železo-chelatační aktivitou ve srovnání s isoliquiritigeninem díky nepřítomnosti dvojné vazby v poloze C2 a glykosylaci hydroxylové skupiny v poloze 6', která snižuje schopnost látky přenášet elektrony. Samostatná -OH skupina má v prostoru menší rozlohu než glykosidicky vázaný cukr, což je výhodnější pro navázání iontů Fe [24]. Neohesperidin dihydrochalkon a naringin dihydrochalkon obsahují tři -OH skupiny umístěné v poloze 2' a 6' kruhu A a 3 (4) kruhu B. Obě tyto látky vykazovaly nižší železo-chelatační aktivitu než testované látky s OH skupinami lokalizovanými v poloze 2' a 4', což by mohlo být způsobeno rezonancí se sousední ketoskupinou (Obr. 27). Naringin DHC a neohesperidin DHC, podobně jako florizin, neobsahovaly oproti isoliquiritigeninu tzv. olefinovou skupinu, která přispívá ke zvýšení železo-chelatační aktivity chalkonů.

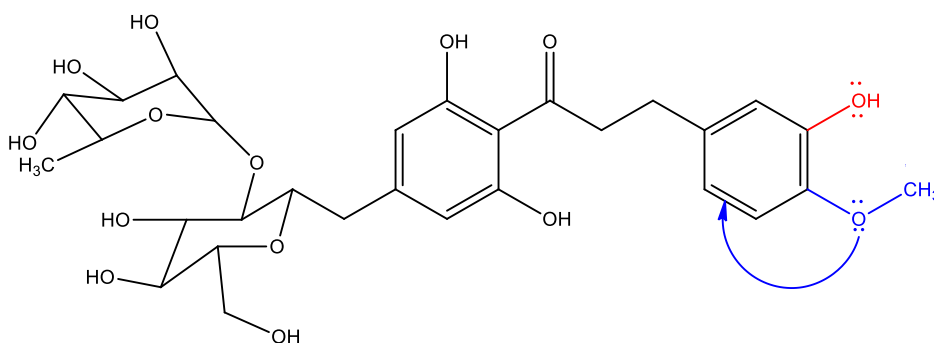


Obrázek 29: Porovnání železo-chelatační aktivity testovaných látek při pH 7,5



Obrázek 30: Porovnání železo-chelatační aktivity testovaných látek při pH 6,8

Neohesperidin DHC má hydroxylovou skupinu a methoxylovou skupinu umístěnou v poloze 3 a 4 na aromatickém kruhu B, což může přispívat ke zvýšení jeho železo-chelatační aktivity. Volný elektronový pár methoxylové skupiny se v případě neohesperidinu DHC dostává do konjugace s aromatickým jádrem a zvyšuje chelatační schopnost 3-OH skupiny (Obr. 31) [20, 24]. Námi naměřené hodnoty však ukazují (Obr. 29), že tyto strukturální rozdíly zřejmě nemají na železo-chelatační aktivitu chalkonů vliv.



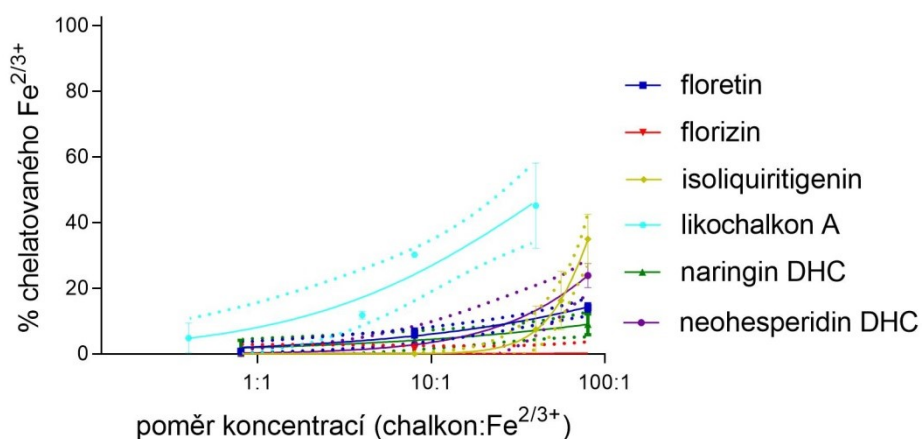
Obrázek 31: Vliv methoxylové skupiny na železo-chelatační aktivitu neohesperidinu dihydrochalkonu [24]

Floretin jako jediný z testovaných látek obsahoval celkem 4 hydroxylové funkční skupiny navázané na aromatickém jádře v poloze 2', 4', 6' kruhu A a 4 kruhu B. Jeho schopnost vázat ionty železa však byla navzdory vyššímu počtu hydroxylových funkčních skupin nízká. Důvodem toho by mohl být příliš vysoký počet OH skupin v molekule floretinu, kdy jedna z těchto hydroxylových skupin částečně stéricky brání vazbě železa na chalkon. Likochalkon A neprokázal téměř žádnou schopnost chelatovat železnaté ionty. Důvodem toho by mohla být skutečnost, že v jeho molekule chybí tzv. keto(-enolová) skupina, kterou obsahovaly všechny ostatní testované látky.

Flavonoidy stejně jako námi testované chalkony (prekurzory flavonoidů) chelatují ionty železa především v neutrálních nebo téměř neutrálních podmínkách (pH 6,8 a 7,5). U flavonoidů je taktéž pro míru železo-chelatační aktivity významná přítomnost volných hydroxylových skupin, zejména 3-hydroxylové skupiny, a sousedních hydroxylových skupin v kruhu A nebo B, jako u chalkonů. U obou typů sekundárních metabolitů rostlin vede zvýšení počtu volných hydroxylových skupin v kruhu ke zlepšení železo-chelatační aktivity. Za kyselějších podmínek však mezi chelatační aktivitou flavonoidů a chalkonů se třemi, dvěma nebo jednou hydroxylovou skupinou nebyly statisticky významné rozdíly. Pro schopnost chelatovat ionty přechodných kovů je stejně jako u chalkonů i u flavonoidů

důležitá přítomnost ketoskupiny. Volná 5-hydroxylová skupina se 4-ketoskupinou může i u flavonoidů zvýšit schopnost chelatovat ionty železa [53].

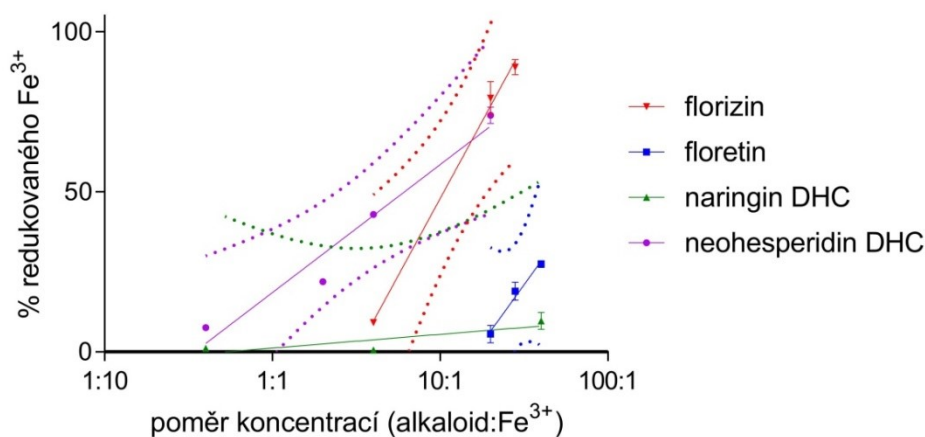
Nejvyšší železo-chelatační aktivitu ve vztahu k $\text{Fe}^{2/3+}$ iontům vykazoval likochalkon A v DMSO (Obr. 32). Mírně vyšší schopnost chelatovat železité ionty prokázal i isoliquiritigenin. Obě tyto látky, na rozdíl od ostatních testovaných látek, obsahují ve své molekule tzv. olefinovou skupinu (Obr. 28), která by mohla zvyšovat schopnost chalkonů vázat železité ionty.



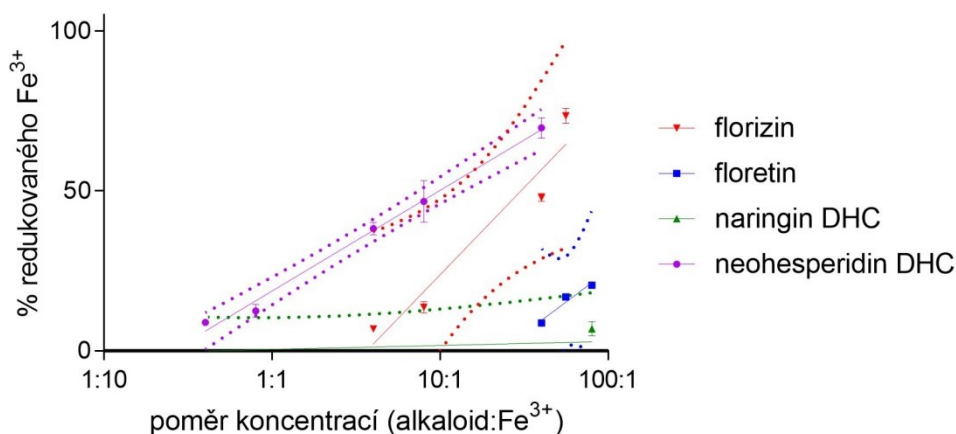
Obrázek 32: Porovnání železo-chelatační aktivity testovaných látek v DMSO

Železo v lidském těle vystupuje jako donor i akceptor elektronů. Kontakt železa s redukčním činidlem (chalkonem) může vyvolat redukci železitých iontů na železnaté, a tím způsobit vznik nebezpečného reaktivního hydroxylového radikálu. Volné radikály následně poškozují buňky a mohou za rozvoj některých onemocnění [12, 25]. Z tohoto důvodu byla v práci kromě železo-chelatační aktivity testována i schopnost chalkonů redukovat ionty železa. Železo-redukující aktivitu projevily pouze čtyři ze šesti testovaných látek, a to dehydrochalkony floretin, florizin, naringin DHC a neohesperidin DHC. Neohesperidin DHC prokázal vyšší železo-redukující účinek než jemu strukturně podobný naringin DHC. Důvodem toho by mohla být přítomnost hydroxylové a methoxylové skupiny v poloze 3 a 4 aromatického kruhu B neohesperidinu DHC. Toto uskupení vykazuje strukturní podobnost s tzv. katecholovým uspořádáním, které je spojeno s železo-redukující aktivitou především u flavonoidů [25]. U glykosidu florizinu byla zaznamenána větší schopnost redukovat železité ionty než u jeho aglykonu floretinu. Porovnání železo-redukující aktivity jednotlivých

testovaných látek v prostředí DMSO a pH 4,5 je znázorněno v následujících grafech (Obr. 33 a 34).



Obrázek 33: Porovnání železo-redukující aktivity testovaných látek v prostředí o pH 4,5



Obrázek 34: Porovnání železo-redukující aktivity testovaných látek v DMSO

U flavonoidů a chalkonů bylo pozorováno zvýšení schopnosti redukovat ionty železa při zvýšení počtu hydroxylových skupin v molekule. Redukční potenciál flavonoidů a stejně tak i chalkonů, zvyšuje přítomnost katecholové skupiny na kruhu B. Náhrada jedné hydroxylové skupiny za methoxylovou skupinu v katecholovém uspořádání je spojena se snížením redukčního potenciálu těchto látek [25].

Některé chalkony, jako např. floretin, jsou v lidském těle metabolizovány za pomoci jaterního cytochromu P450. Jedním z hlavních metabolitů floretinu je 3-OH floretin, který vzniká také při rozkladu glykosidu florizinu bakteriemi [27]. Při přeměně těchto látek dochází

k zavedení další hydroxylové skupiny do jejich molekuly, což může vést ke zvýšení železo-chelatační i železo-redukující aktivity těchto metabolitů.

7 Závěr

Tato diplomová práce se zabývala stanovením železo-chelatačních a železo-redukujících účinků u vybraných chalkonů v DMSO a prostředí o různých pH (4,5; 5,5; 6,8; 7,5). Cílem této diplomové práce bylo na základě získaných výsledků odvodit vztah mezi strukturou testovaných látek a jejich železo-chelatační a železo-redukující aktivitou. Pro vypracování práce byly vybrány tyto látky: isoliquiritigenin, naringin dihydrochalkon, neohesperidin dihydrochalkon, likochalkon A, floretin a florizin.

Získané hodnoty ukazují, že chalkony chelatují ionty železa především v neutrálních nebo téměř neutrálních podmínkách (pH 6,8 a 7,5). Nejúčinnějším chelátorem železnatých iontů ze všech testovaných látek je isoliquiritigenin, u něhož se zároveň neprojevila nežádoucí železo-redukující aktivita. Druhým nejlepším chelátorem železnatých iontů byl florizin. Tato látka však oproti isoliquiritigeninu vykazovala vysokou schopnost redukovat ionty železa při pH 4,5 a v prostředí DMSO. U ostatních testovaných látek (likochalkon A, naringin DHC, neohesperidin DHC a floretin) byla zjištěna pouze nízká schopnost vázat železnaté ionty. Tyto látky navíc disponovaly vysokým železo-redukujícím účinkem při pH 4,5 a v prostředí DMSO. Likochalkon A vykazoval nejvyšší železo-chelatační aktivitu ze všech testovaných látek vzhledem k železitým iontům v prostředí DMSO.

Železo-chelatační a železo-redukující schopnosti testovaných látek se projevily až při vyšších koncentračních poměrech (chalkon:Feⁿ⁺), kterých v lidském organismu nemůžeme dosáhnout. Z toho vyplývá, že běžná konzumace ovoce (floretin, florizin), léčivých rostlin (isoliquiritigenin, likochalkon A) a umělých sladidel (neohesperidin DHC, naringin DHC) s obsahem chalkonů pravděpodobně nevede k jejich interakci se železem.

Chalkony, které dobře chelatují ionty železa mají obvykle hydroxylovou skupinu situovanou v poloze 2' a 4' aromatického kruhu A a obsahují tzv. olefinovou, katecholovou nebo keto(-enolovou) skupinu.

8 Seznam použitých zkratk

DHC	dihydrochalkon
DMSO	dimethylsulfoxid
DMT1	divalent metal transporter 1
EU	Evropská unie
HA	hydroxylamin hydrochlorid
HCP	heam carrier protein
HEPES	(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin ethansulfonová kyselina)
ILG	isoliquiritigenin
JNK	c-Jun N-terminal kinases
LCH A	likochalkon A
+M	kladný mezomerní efekt
MCH	mean cell hemoglobin (množství hemoglobinu v jednom erytrocytu)
MCHC	mean cell hemoglobin concentration (střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytech)
MCV	mean cell volume (střední objem erytrocytu)
OH	hydroxylová skupina
pH	potential of hydrogen (potenciál vodíku)
SGLT1	sodium-glucose transporter 1
SGLT2	sodium-glucose transporter 2
TAS1R2	taste receptor type 1 member 2
TAS1R3	taste receptor type 1 member 3
TETA	triethyltetraamin

TI	talasemia intermedia
TM	talasemia major
TRSV	tabacco ring spot virus
UV-B	ultrafialové záření typ B

9 Použitá literatura a zdroje

- [1] Mládek A., Vokurka M., Kofránek J.: Matematický model regulace železa v organismu. *Medsoft*, Roztoky u Prahy 2020.
- [2] Novotný J.: Sideropenická anémie. *Med Pro Praxi* 4 (11), 390–394 (2007).
- [3] Bravo L.: Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 56 (11), 317–333 (1998).
- [4] Cushnie T., Lamb A. J.: Antimicrobial activity of flavonoids. *Inj J of Antimicrob Agents* 26, 343–356 (2005).
- [5] Zhuang Ch., Zhang W., Sheng Ch., Zhang W., Xing Ch., Miao Z.: Chalcone: A privileged structure in medicinal chemistry. *Chem Rev* 117 (12), 7762–7810 (2017).
- [6] De Freitas Silva M., Pruccoli L., Morroni F., Sita G., Seghetti F., Viegas C., Tarozzi A.: The Keap1/Nrf2-ARE pathway as a pharmacological target for chalcones. *Molecules* 23 (7), 1803 (2018).
- [7] Mladenka P., Zatloukalová L., Filipický T., Hrdina R.: Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radic Biol Med* 49 (6), 963–75 (2010).
- [8] Seifert B., Býma S. et al.: *Všeobecné praktické lékařství*, 2. vydání. Galén, Praha 2014.
- [9] Silbernagl S., Lang F.: *Atlas patofyziologie*, 2. překlad. Nakladatelství Karolinum, Praha 2007.
- [10] Nečas E. et al.: *Obecná patologická fyziologie*, 1. dotisk. Grada Publishing, a.s., Praha 2012.
- [11] Papanikolaou G., Pantopoulos K.: Iron metabolism and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 202, 199–211 (2005).
- [12] Sedláčková T., Racek J.: Metabolismus železa a jeho regulace. *Klin Biochem Metab* 1, 17–23 (2009).
- [13] Kelner P. et al.: *Vnitřní lékařství*. 4. vydání. Galén, Praha 2011.
- [14] Ganz T., Nemeth E.: Hepcidin and iron homeostasis. *Biochim Biophys Acta* 1823, 1434–1443 (2012).
- [15] Shersten K., Bennett J. M., Chambers M. D.: Iron deficiency Anemia. *Am Fam Physician* 75, 5 (2007).
- [16] Kontoghiorghes C. N., Kontoghiorghes G. J.: Efficacy and safety of iron-chelation therapy with deferoxamine, deferiprone, and deferasirox for the treatment of

- iron-loaded patients with non-transfusion-dependent thalassemia syndromes. *Drug Des Devel Ther* 10, 465–481 (2016).
- [17] Zeng L., Tan L., Li H., Zhang Q., Li Y., Guo J.: Deferoxamine therapy for intracerebral hemorrhage: A systematic review. *PLoS One* 12 (3), (2018).
- [18] Franz K. J.: Clawing back: broadening the notion of metal chelators in medicine. *Curr Opin Chem Biol* 17 (2), 143–149 (2013).
- [19] Flora S. J. S., Pachauri V.: Chelation in metal intoxication. *Int J Environ Res Public Health* 7, 2745–2788 (2010).
- [20] Sulpizio C., Breibeck J., Rompel A.: Recent progress in synthesis and characterization of metal chalcone complexes and their potential as bioactive agents. *Coord Chem Rev* 374, 497–524 (2018).
- [21] Sugihara N., Arakawa T., Ohnishi M., and Furuno K.: Anti- and pro-oxidative effects of flavonoids on metal-induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with alpha-linolenic acid. *Free Radic Biol Med* 27 (11-12), 1313–23 (1999).
- [22] Shivani T., Bhavesh S.: A review: Chemical and biological activity of chalcones with their metal complex. *Asian J Pharm Sci* 10, 70 (2020).
- [23] Machala M., Kubínová R., Horavová P., Suchý V.: Chemoprotective potentials of homoisoflavonoids and chalcones of *Dracaena cinnabari*: modulations of drug-metabolizing enzymes and antioxidant activity. *Phytother Res* 15 (2), 114–8 (2001).
- [24] Li X., Chen B., Xie H., He Y., Zhong D., Chen D.: Antioxidant Structure-Activity Relationship Analysis of Five Dihydrochalcones. *Molecules* 23 (5), 1162 (2018).
- [25] Macáková K., Mladěnka P., Filipický T., Říha M., Jahodář L., Trejtnar F., Bovicelli P., Proietti Silvestri I., Hrdina R., Saso L.: Iron reduction potentiates hydroxyl radical formation only in flavonols. *Food Chem* 135 (4), 2584–92 (2012).
- [26] Harmatha.J.: *Fenylpropanoidy, lignany a jejich biologické účinky*. Chemie a biochemie přírodních látek. Cyklus Organická chemie, svazek 27. Str. 117–142. ÚOCHB-AVČR, Praha 2002.
- [27] Feng X., Li Y., Brobbey Oppong M., Qiu F.: Insights into the intestinal bacterial metabolism of flavonoids and the bioactivities of their microbe-derived ring cleavage metabolites. *Drug Metab Rev* 50 (3), 343–356 (2018).
- [28] Braune A., Engst W., Blaut M.: Degradation of neohesperidin dihydrochalcone by human intestinal bacteria. *J Agric Food Chem* 53 (5), 1782–90 (2005).

- [29] Mahapatra D. K., Bharti S. K., Asati V., Singh S. K.: Perspectives of medicinally privileged chalcone based metal coordination compounds for biomedical applications. *Eur J Med Chem* 174, 142–158 (2019).
- [30] Ramalingam M., Kim H., Lee Y., Lee Y.: Phytochemical and pharmacological role of liquiritigenin and liquiritigenin and isoliquiritigenin from radix glycyrrhizae in human health and disease models. *Front Neurosci* 10, 348 (2008).
- [31] Mahalingam S., Gao L., Eisner J. Helferich., Flaws J. A.: Effect of isoliquiritigenin on ovarian antral follicle growth and steroidogenesis. *Reprod Toxicol* 66, 107–114 (2016).
- [32] Sulaiman R. S., Basavarajappa H. D., Corson T. W.: Natural product inhibitors of ocular angiogenesis. *Exp Eye Res* 129, 161–171 (2014).
- [33] Chen M., Theander T. G., Christensen S. B., Hvid L., Zhai L., Kharazmi A.: Licochalcone A, a new antimalarial agent, inhibits in vitro growth of the human malaria parasite Plasmodium falciparum and protect mice from P. yoelii infection. *Antimicrob agents and chemother* 38 (7), 1470–1475 (1994).
- [34] Busquets O., Ettcheto M., Cano A., R Manzine P., Sánchez-Lopez E., Espinosa Jiménez T., Verdaguer E., Dario Castro-Torres R., Beas-Zarate C., X. Sureda F., Olloquequi J., Auladell C., Folch J., Camins A.: Role of c Jun N terminal kinase (JNKs) in epilepsy and metabolic cognitive impairment. *Int J Mol Sci* 31 (1), 255 (2019).
- [35] Sidhu T., Shankargouda S., Rath A., Ramamurthy P. H., Fernandes B., Singh A. K.: Therapeutic benefits of liquorice in dentistry. *J Ayurveda Inter Med* 11 (1), 82–88 (2020).
- [36] Choi B. Y.: Biochemical basis of anti-cancer-effects of phloretin-A natural dihydrochalcone. *Molecules* 24 (2), 278 (2019).
- [37] Londzin P., Siudak S., Cegiela U., Pytlik M., Janas A., Waligóra A., Folwarczna J.: Phloridzin, an apple polyphenol, exerted unfavorable effects on bone and muscle in an experimental model of type 2 diabetes in rats. *Nutrients* 10 (11), 1701 (2018).
- [38] Mariadoss A. V. A., Vinyagam R., Rajamanickam V., Sankaran V., Venkatesan S., David E.: Pharmacological Aspects and Potential Use of Phloretin: A Systemic Review. *Mini Rev Med Chem* 19 (13), 1060–1067 (2019).
- [39] Wang G., Gao Y., Wang H., Wang J., Niu X.: Phloretin reduces cell injury and inflammation mediated by Staphylococcus aureus via targeting sortase B and the molecular mechanism. *Appl Microbiol Biotechnol* 102 (24), 10665–10674 (2018).

- [40] Behzad S., Sureda A., Barreca D., Fazel Nabavi S., Rastrelli L., Mohammad Nabavi S.: Health effects of phloretin: from chemistry to medicine. *Phytochem Rev* 16, 527–533 (2017).
- [41] Idris I., Donnelly R.: Sodium-glucose co-transporter-2 inhibitors: an emerging new class of oral antidiabetic drug. *Diabetes Obes Metab* 11 (2), 79–88 (2009).
- [42] Bharti S., Rani N., Krishnamurthy B., Singh Arya D.: Preclinical evidence for the pharmacological actions of naringin: A Review. *Planta Med* 80, 437–451 (2014).
- [43] Stompor M., Broda D., Bajek-Bil A.: Dihydrochalcones: Methods of acquisition and pharmacological properties-A first systematic review. *Molecules* 24, 4468 (2019).
- [44] Lapčík O., Čopíková J., Uher M., Moravcová J., Drašar P.: Necukerné přírodní látky sladké chuti. *Chem. Listy* 101, 44–54 (2007)
- [45] Inglett G. E.: Sweeteners-A review. *Food Technol*, 37–41 (1981).
- [46] Harald A. B., Chang L., Chang C. A.: Physiological Effects of Sucrose Substitutes and Artificial Sweeteners on Growth Pattern and Acid Production of Glucose-Grown *Streptococcus mutans* Strains in vitro. *Z. Naturforsch* 31, 245–251 (1976).
- [47] Nguyen T. H. H., Woo S. M., Nguyen N. A., Cha G. S., Yeom S. J., Kang H. S., Yun Ch. H.: Regioselective Hydroxylation of Naringin Dihydrochalcone to Produce Neohesperidin Dihydrochalcone by CYP102A1 (BM3) Mutants. *Catalysts* 10, 823 (2020).
- [48] Bobrovová Z.: Umělá sladidla a jejich bezpečnost. *Edukafarm* 2, 69–72 (2008).
- [49] O'Brien-Nabors L.: *Alternative sweeteners*, 3. vydání. Marcel Dekker, Inc, New York 2001.
- [50] Han G. E., Kang H. T., Chung S., Lim C., Linton J. A., Lee J. H., Kim W., Kim S. H., Lee J. H.: Novel Neohesperidin Dihydrochalcone Analogue Inhibits Adipogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells through the Nrf2 Pathway. *Int J Mol Sci* 19 (8), 2215 (2018).
- [51] Yi R., Tian Y., Tan F., Li W., Mu J., Long X., Pan Y., Zhao X.: Intervention effect of *Malus pumila* leaf flavonoids on senna-induced acute diarrhea in BALB/c mice. *Food Sci Nutr* 8 (5), 2535–2542 (2020).
- [52] Hiršová D.: *Chemické názvosloví. Základní pravidla českého, tradičního latinského a mezinárodního latinského lékopisného názvosloví*, 2. vydání. Nakladatelství Karolinum, Praha 2004.

- [53] Mladěnka P., Macáková K., Filipský T., Zatloukalová L., Jahodář L., Bovicelli P., Silvestri I. P., Hrdina R., Saso L.: In vitro analysis of iron chelating activity of flavonoids. *J Inorg Biochem* 105 (5), 693–701 (2011).

10 Seznam obrázků

Obrázek 1: 2-fenyl-benzo[α]pyran, flavanon, základní skelet flavonoidů [4].....	17
Obrázek 2: difenylprop-2-en-1-on, základní skelet chalkonů [5].....	17
Obrázek 3: Isoliquiritigenin [30].....	20
Obrázek 4: Likochalkon A [33].....	21
Obrázek 5: Floretin [36].....	22
Obrázek 6: Florizin [41].....	22
Obrázek 7: Naringin dihydrochalkon [47].....	23
Obrázek 8: Neohesperidin dihydrochalkon [43].....	24
Obrázek 9: Schéma mikrotitrační destičky kalibrační křivky	27
Obrázek 10: Schéma mikrotitrační destičky při stanovení chelatace Fe^{2+} v pufru o pH 4,5; 5,5 a 6,8.....	28
Obrázek 11: Schéma mikrotitrační destičky při stanovení chelatace Fe^{2+} v pufru o pH 7,5... 30	
Obrázek 12: Schéma mikrotitrační destičky při stanovení chelatace Fe^{3+} v pufru o pH 4,5... 31	
Obrázek 13: Schéma mikrotitrační destičky při stanovení chelatace Fe^{3+} v DMSO.....	33
Obrázek 14: Schéma mikrotitrační destičky při stanovení redukce Fe^{3+} v pufru o pH 4,5; 5,5;	34
Obrázek 15: Schéma mikrotitrační destičky při stanovení redukce Fe^{3+} v DMSO.....	35
Obrázek 16: Kalibrační křivka.....	37
Obrázek 17: Železo-chelatační aktivita isoliquiritigeninu.....	39
Obrázek 18: Železo-chelatační aktivita likochalkonu A	39
Obrázek 19: Železo-chelatační aktivita floretinu.....	39
Obrázek 20: Železo-chelatační aktivita florizinu	40
Obrázek 21: Železo-chelatační aktivita naringinu dihydrochalkonu.....	40
Obrázek 22: Železo-chelatační aktivita neohesperidinu dihydrochalkonu.....	40
Obrázek 23: Železo-redukující aktivita floretinu	41
Obrázek 24: Železo-redukující aktivita florizinu	42
Obrázek 25: Železo-redukující aktivita naringinu dihydrochalkonu	42
Obrázek 26: Železo-redukující aktivita neohesperidinu dihydrochalkonu	42
Obrázek 27: Testované látky (červeně – hydroxylová skupina, modře – methoxylová skupina)	44
Obrázek 28: Tři hlavní domény chalkonů pro interakci s kovy [20].....	44
Obrázek 29: Porovnání železo-chelatační aktivity testovaných látek při pH 7,5	45

<i>Obrázek 30: Porovnání železo-chelatační aktivity testovaných látek při pH 6,8</i>	<i>45</i>
<i>Obrázek 31: Vliv methoxylové skupiny na železo-chelatační aktivitu neohesperidinu dihydrochalkonu [24].....</i>	<i>46</i>
<i>Obrázek 32: Porovnání železo-chelatační aktivity testovaných látek v DMSO</i>	<i>47</i>
<i>Obrázek 33: Porovnání železo-redukující aktivity testovaných látek v prostředí o pH 4,5</i>	<i>48</i>
<i>Obrázek 34: Porovnání železo-redukující aktivity testovaných látek v DMSO</i>	<i>48</i>

11 Seznam tabulek

<i>Tabulka 1: Naměřené hodnoty absorbancí</i>	<i>37</i>
---	-----------

12 Seznam rovnic

Rovnice 1: Haber-Weiss-Fentonova reakce, převzato [7]	16
---	----

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky

Kandidát: Jana Faberová

Školitel: doc. Ing. Kateřina Macáková, Ph.D.

Název diplomové práce: Interakce chalkonů s přechodnými kovy I.

Železo je biogenní kovový prvek s nepárovými d-elektrony, který hraje klíčovou roli v přežití jednobuněčných organismů, rostlin i savců. Elektronový obal atomu železa je schopný snadno vázat a uvolňovat elektrony, a tím se podílet na správné funkci organismu. Železo je nezbytné pro zajištění transportu dýchacích plynů, diferenciaci buněk a fungování některých specifických enzymů. Nicméně, i přes jednoznačně pozitivní vliv železa na lidské zdraví může nevhodně nízká nebo vysoká hladina železa v těle způsobovat rozvoj celé řady onemocnění.

Chalkony jsou rostlinné polyfenoly patřící do rodiny flavonoidů, sekundárních metabolitů rostlin. Termín chalkon se obecně vztahuje k chemické struktuře s α,β -nenasyceným ketonovým systémem, jejíž základ tvoří 1,3-difenyprop-2-en-1-on. Tyto látky vykazují široké spektrum biologických aktivit a ve správném množství mohou být prospěšné lidskému zdraví. Cílem této diplomové práce bylo sledovat železo-chelatační a železo-redukční aktivitu vybraných chalkonů: isoliquiritigeninu, likochalkonu A, floretinu, florizinu, naringinu dihydrochalkonu a neohesperidinu dihydrochalkonu. Měření bylo prováděno v prostředí o různém pH (4,5; 5,5; 6,8 a 7,5) za pomoci spektrofotometru. Na závěr této práce byl stanoven vztah mezi strukturou a účinkem.

Nejúčinnějším chelátorem ze všech testovaných látek byl chalkon isoliquiritigenin extrahovaný z kořene a oddenků rostliny *Glycyrrhiza glabra* L., *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. a *Glycyrrhiza inflata* Batalin. U této látky se zároveň neprojevila žádná nežádoucí

železo-redukční aktivita. Druhou nejvíce chelatující látkou byl florizin, který však vykazoval vysokou schopnost redukovat ionty železa.

Klíčová slova: železo, chalkon, chelatace, redukce

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Botany

Candidat: Jana Faberová

Supervisor: doc. Ing. Kateřina Macáková, Ph.D.

Title of Thesis: Interaction of chalcones with transition metals I.

Iron is a biogenic metal element with unpaired d-electrons that plays a key role in the survival of unicellular organisms, plants and mammals. The electron shell of the iron atom is able to easily bind and release electrons and thus contribute to the proper function of the organism. Iron is necessary to ensure the transport of respiratory gases, cell differentiation and the functioning of some specific enzymes. However, despite the clearly positive effect of iron on human health, inappropriately low or high level of iron in the body can cause the development many diseases.

Chalcones are plant polyphenols belonging to the family of flavonoids, secondary metabolites of plants. The term chalcone generally refers to a chemical structure with an α,β -unsaturated ketone system based on 1,3-diphenylprop-2-en-1-on. These substances have a wide spectrum of biological activities and in the right amount can be good for human health. The aim of this diploma thesis was to monitor the iron-chelating and iron-reducing activity of selected chalcones: isoliquiritigenin, licochalcon A, phloretin, phlorizin and naringin dihydrochalcon neohesperidin dihydrochalcon. The measurements were performed in an environment with different pH (4,5; 5,5; 6,8 and 7,5), using a spectrophotometer. At the end of this thesis, the relationship between structure and effect was determined.

The most effective chelator of all tested substances was chalcone isoliquiritigenin extracted from the root and rhizomes of *Glycyrrhiza glabra* L., *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. and *Glycyrrhiza inflata* Batalin. At the same time, this substance did not show any undesired

iron-reducing activity. The second most chelating agent was florizin, which also has a high iron-reducing activity.

Keywords: iron, chalcone, chelation, reduction