

# Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakognozie a farmaceutické botaniky

**Kandidát:** Mgr. Zuzana Lomozová  
**Školitel:** prof. PharmDr. Přemysl Mladěnka, Ph.D.  
**Název disertační práce:** Interakce přírodních fenolických látek s biogenními kovy

Fenolické látky jsou jednou z nejrozšířenějších skupin sekundárních metabolitů rostlin. Jsou nedílnou součástí lidské stravy a jejich konzumace se spojuje s řadou pozitivních účinků. Řadíme mezi ně široké spektrum látek od jednoduchých molekul, jako jsou fenolové kyseliny, až po velké polymerní sloučeniny, jako jsou taniny. Díky své struktuře zahrnující mimo jiné volné hydroxylové skupiny jsou schopny interagovat s biogenními kovy a vytvářet s nimi kovové komplexy. Za normálních podmínek je homeostáza těchto přechodných kovů v organismu pečlivě regulována, k jejímu narušení však může dojít při patologických stavech jako je např. akutní infarkt myokardu, kdy následkem výrazného snížení pH dochází ke zvýšení hladiny volného železa a mědi, stejně tak u zánětlivých a neurodegenerativních onemocnění, tumorech nebo diabetu mellitu.

Cílem této disertační práce bylo zjistit, jak tyto látky reagují s biogenními kovy pomocí *in vitro* a *ex vivo* metod, tj. zda jsou schopny chelátovat nebo redukovat ionty přechodných kovů jako jsou železo a měď, jaký mají vliv na produkci volných hydroxylových radikálů vznikajících v kovy-indukované Fentonově reakci a jak ovlivňují mědi-spouštěnou lýzu červených krvinek.

V rámci této práce byly otestovány látky ze skupin dehydroflavonolignanů, flavonoidů a jejich metabolitů. Nejprve byla u látek stanovena schopnost chelátovat ionty přechodných kovů, což je jedním z mechanismů účinku antioxidantů. Měď a železo-chelatační aktivita látek byla určena za čtyř (pato)fyziologicky relevantních pH podmínek pomocí spektrofotometrických kompetitivních metod využívající bathokuproindisulfonát

nebo hematoxylin pro stanovení množství chelatace měďných a měďnatých iontů, a ferrozín pro stanovení chelatace železnatých a železitých iontů. Předchozí studie skupiny ukázaly na dobrou chelatační aktivitu některých flavonoidů i flavonolignanu 2,3-dehydrosilybinu. V rámci této disertace byly tyto informace doplněny o 2 methyl-metabolity kvercetin, isorhamnetin a tamarixetin. Oba vykazaly vysokou chelatační aktivitu pro měď i železo. U jejich vznikajících kovových komplexů byla dále určena stechiometrie pomocí spektrofotometrických nekompetitivních metod (Jobova a naší skupinou vyvinutá komplementární metoda) a vypočítána stabilitní konstanta pomocí spektrofotometrické a potenciometrické metody. Současně byla prokázána schopnost dalšího flavonolignanu 2,3-dehydrosilychristinu chelatovat ionty železa i mědi.

Zmíněné kompetitivní metody byly v mírně pozměněné verzi použity i k otestování schopnosti redukovat měďnaté a železité ionty u rozsáhlé skupiny 24 flavonoidů pro zjištění vztahu mezi strukturou a účinkem. Ionty v nižším valenčním stavu jsou totiž následně schopny katalyzovat tvorbu hydroxylových radikálů z peroxidu vodíku s následným navozením oxidačního stresu. Drtivá většina testovaných látek byla schopna redukovat měďnaté ionty a hodně z nich dosáhlo kompletní 100% redukce. 5-hydroxyflavon a chrysin, tj. látky s 2,3-dvojnou vazbou ale neobsahující 3-hydroxyskupinu a také žádnou hydroxylovou skupinu na kruhu B, byly jako jediné schopny snížit spontánní redukci měďnatých iontů v pH 6,8 a 7,5.

U látek, které jsou schopny jak chelatovat, tak redukovat kovové ionty je těžké teoreticky určit vliv na Fentonovu reakci, a tedy výslednou produkci hydroxylových radikálů. Z toho důvodu byla použita citlivá HPLC metodika s coulometrickou detekcí pro detekci hydroxylového radikálu. Do této studie byly zařazeny jak zmíněné flavonoidy, tak chelatačně účinné 2,3-dehydroflavonolignany. Tři testované flavonoidy, 3-hydroxyflavon, 5-hydroxyflavon a troxerutin byly schopny zablokovat měďi-spouštěnou Fentonovu reakci a měly tak čistě antioxidační působení. 5-hydroxyflavon vykázal nejsilnější antioxidační aktivitu. Vliv testovaných flavonolignanů byl variabilní v závislosti na pH a typu kovu.

K ověření antioxidačního či pro-oxidačního působení látek v *ex vivo* podmínkách bylo použito stanovení vlivu na měďi-vyvolanou lýzu červených krvinek. Naprostá většina testovaných látek měla na červené krvinky protektivní účinky a ukázala se jako antioxidační, eventuálně v několika případech jako neutrální. Pouze nesubstituovaný flavon zvýšil hemolýzu a měl tedy pro-oxidační aktivitu. Přidáním hydroxylové skupiny ať už v poloze 3,

5 nebo 7 došlo nejen k zablokování pro-oxidačního působení, ale taková substituce vedla také k výrazné ochraně červených krvinek. Analogicky, i 5 z 6 testovaných flavonolignanů ochránilo červené krvinky před lýzou navozenou přídatkem mědi.

V rámci této disertační práce byla také vyvinuta a publikována nová metoda pro screening potencionálních chelátorů kobaltnatých iontů a zhodnocení jejich toxicity. Tato metoda umožňuje velmi citlivé, levné a rychlé měření v širokém rozpětí pH 4,5-7,5, za použití disodné soli kyseliny 1-nitroso-2-naftol-3,6-disulfonové.

Závěrem lze shrnout, že tyto publikované práce týkající se fenolických látek, které tvoří součást naší potravy a jejich metabolitů, naznačují možné protektivní účinky na lidský organismus. I přestože se některé látky ukázaly v *in vitro* testech jako pro-oxidační, v *ex vivo* podmínkách bylo jejich působení protektivní.