

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmakognozie a farmaceutické botaniky



**Interakce přírodních fenolických látek s biogenními kovy**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Vedoucí práce: prof. PharmDr. Přemysl Mladěnka, Ph.D.



„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně pod vedením svého školitele prof. PharmDr. Přemysla Mladěny, Ph.D. Uvedená literatura a další zdroje, z nichž bylo při psaní práce čerpáno, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a jsou v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové .....

.....  
Mgr. Zuzana Lomozová

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli prof. PharmDr. Přemyslu Mladěnkovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost a podporu během celé doby mého studia. Mé poděkování in memoriam bych ráda směřovala i mé předchozí školitelce doc. Kateřině Macákové, Ph.D. za její podporu během prvních dvou let mého studia. Mé poděkování také patří všem kolegům z výzkumné skupiny Kardiovaskulární a respirační farmakologie a toxikologie a členům Katedry farmakognozie a farmaceutické botaniky, kteří se mnou sdíleli všechny strasti i radosti s postgraduálním studiem spojené.

Rovněž bych touto cestou chtěla vyjádřit poděkování své rodině a přáteli, kteří mě po celou dobu studia podporovali a dodávali odvalu čelit novým výzvám.

Za finanční podporu děkuji Univerzitě Karlově (projekt SVV 260 550 a IGRA na UK CZ.02.2.69/0.0/0.0/19\_073/0016935), bez které by tato práce nemohla vzniknout.



# 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)fyzilogicky 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.



# Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany

**Candidate:** Zuzana Lomozová, MSc.  
**Supervisor:** Prof. Přemysl Mladěnka, PharmD., Ph.D.  
**Title of Doctoral Thesis:** Interactions of natural phenolic compounds with biogenic metals

Phenolic compounds are one of the most widely distributed groups of secondary plant metabolites. They are an integral part of the human diet and their consumption is associated with a number of positive effects. They include a wide range of substances, from simple molecules such as phenolic acids to large polymeric compounds such as tannins. Because of their structure, which includes, among others, free hydroxyl groups, they are able to interact with biogenic metals and form metal complexes with them. Under normal conditions, the homeostasis of these transition metals in the body is tightly regulated, but it can be disturbed in pathological conditions such as acute myocardial infarction, when the levels of free iron and copper increase as a result of a significant decrease in pH. Similar metal imbalance is observed as well as in inflammatory and neurodegenerative diseases, tumours, or diabetes mellitus.

The aim of this dissertation was to find out how these substances react with biogenic metals using *in vitro* and *ex vivo* methods, i.e., whether they can chelate or reduce ions of transition metals such as iron and copper, what effect they have on the production of hydroxyl radicals formed *via* the metal-induced Fenton reaction and how they impact copper-triggered lysis of red blood cells.

As part of this work, substances from the groups of dehydroflavonolignans, flavonoids, and their metabolites were tested. First, the ability of substances to chelate transition metal ions was determined, which is one of the mechanisms of action of antioxidants. The copper and iron-chelating activity of the substances was determined

under four (patho)physiologically relevant pH conditions by spectrophotometric competitive methods using bathocuproindisulfonate or hematoxylin to determine the amount of cuprous and cupric ions chelation, and ferrozine to determine the chelation of ferrous and ferric ions. Previous studies by our group showed significant chelating activity of some flavonoids, as well as of flavonolignan 2,3-dehydrosilybin. As part of this dissertation, these data were supplemented with 2 methyl metabolites of quercetin, isorhamnetin, and tamarixetin. Both showed high copper and iron chelating activity. The stoichiometry of their formed metal complexes was further determined using non-competitive spectrophotometric methods (Job's method and the complementary method developed by our group) and the stability constants were calculated using spectrophotometric and potentiometric methods. Simultaneously, the ability of the flavonolignan 2,3-dehydrosilychristin to chelate both iron and copper ions was demonstrated.

The aforementioned competitive methods were also used in a slightly modified version to determine the ability to reduce copper and iron ions in a large group of 24 flavonoids to determine the relationship between structure and activity. Ions in a lower valence state can subsequently catalyse the formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide and lead therefore to oxidative stress. The vast majority of the tested substances were able to reduce copper ions, and many of them achieved complete 100% reduction. 5-hydroxyflavone and chrysin, i.e. substances with a 2,3-double bond but not containing a 3-hydroxy group and also no hydroxyl group on ring B, were the only once able to decrease the spontaneous reduction of copper ions at pH 6.8 and 7.5.

For substances that are capable of both chelating and reducing metal ions, it is difficult to determine theoretically the effect on the Fenton reaction and the production of hydroxyl radicals. For that reason, the effect of the substances was determined using a sensitive HPLC method with coulometric detection. Both mentioned flavonoids and the effective chelators from 2,3-dehydroflavonolignan class were included in this study. The three tested flavonoids, 3-hydroxyflavone, 5-hydroxyflavone, and troxerutin, were able to block the copper-triggered Fenton reaction and had hence antioxidant activity with 5-hydroxyflavone demonstrating the strongest effect. The effect of the tested flavonolignans was variable depending on the pH and type of metal.

To verify the antioxidant or pro-oxidative action of substances under *ex vivo* conditions, the determination of the effect on copper-induced lysis of red blood cells was used. The vast majority of tested compounds had protective effects on red blood cells and proved to be antioxidant, alternatively neutral in few cases. Only the unsubstituted flavone increased hemolysis and had pro-oxidative activity. The addition of a hydroxyl group, at position 3, 5 or 7, not only blocked the pro-oxidative action but also led to significant protection of red blood cells. Analogously, 5 of 6 tested flavonolignans protected red blood cells from lysis induced by the addition of copper.

As part of this dissertation, a new method for screening potential cobalt chelators and evaluating their toxicity was also developed and published. This method enables very sensitive, rapid and cheap measurements in a wide range of pH (4.5-7.5), using the disodium salt of 1-nitroso-2-naphthol-3,6-disulfonic acid.

In conclusion, we can summarize that these published works concerning phenolic substances that are part of our food and their metabolites indicate possible protective effects on the human organism. Although some substances were shown to be pro-oxidative in *in vitro* tests, their action was protective in *ex vivo* conditions.

# OBSAH

<b>1 ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2 TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>3</b>
2.1 Fenolické látky.....	3
2.1.1 Jednoduché fenoly.....	7
2.1.2 Fenolické kyseliny.....	8
2.1.3 Lignany.....	10
2.1.4 Stilbeny.....	13
2.1.5 Kumariny.....	14
2.1.6 Flavonoidy.....	15
2.1.6.1 Metabolismus flavonoidů.....	19
2.1.6.2 Antioxidační působení flavonoidů.....	21
2.1.6.3 Pro-oxidační působení flavonoidů.....	24
2.2 Biogenní kovy.....	25
2.2.1 Železo.....	27
2.2.2 Měď.....	30
2.2.3 Kobalt.....	32
<b>3 CÍL PRÁCE</b> .....	<b>33</b>
<b>4 RECENZOVANÉ ODBORNÉ PUBLIKACE S IMPAKT FAKTOREM, KTERÉ SE VZTAHUJÍ K TÉMATU DISERTAČNÍ PRÁCE</b> .....	<b>34</b>
4.1 <i>Dehydroflavonolignans from silymarin potentiate transition metal toxicity in vitro but are protective for isolated erythrocytes ex vivo</i> .....	34
4.2 <i>Chelation of iron and copper by quercetin B-ring methyl metabolites, isorhamnetin and tamarixetin, and their effect on metal-based Fenton chemistry</i> .....	35
4.3 <i>The effect of flavonoids on the reduction of cupric ions, the copper-driven Fenton reaction and copper-triggered haemolysis</i> .....	36
4.4 <i>A complex methodological approach for the screening of efficient and safe cobalt chelators</i> .....	37
<b>5 PODÍL KANDIDÁTA NA JEDNOTLIVÝCH PUBLIKACÍCH</b> .....	<b>38</b>
<b>6 KOMENTÁŘ K PUBLIKOVANÝM PRACEM</b> .....	<b>40</b>

<b>7 RECENZOVANÉ ODBORNÉ PUBLIKACE S IMPAKT FAKTOREM, KTERÉ SE NEVZTAHUJÍ K TĚMATU DISERTAČNÍ PRÁCE.....</b>	<b>48</b>
7.1 <i>Interactions of isoquinoline alkaloids with transition metals iron and copper.....</i>	<i>48</i>
7.2 <i>Effects of heme site (FA1) ligands bilirubin, biliverdin, hemin, and methyl orange on the albumin binding of Site I marker warfarin: Complex allosteric interactions.....</i>	<i>48</i>
<b>8 SEZNAM OBRÁZKŮ.....</b>	<b>49</b>
<b>9 SEZNAM ZKRATEK.....</b>	<b>50</b>
<b>10 PREZENTACE VÝSLEDKŮ NA KONFERENCÍCH.....</b>	<b>51</b>
10.1 Přednášky.....	51
10.2 Plakátová sdělení.....	51
<b>11 POUŽITÁ LITERATURA.....</b>	<b>52</b>

# 1 ÚVOD

Fenolické látky jsou sekundárními metabolity rostlin, které jsou v rostlinné říši široce rozšířeny. V současné době je známo kolem osmi tisíc zástupců této skupiny. V rostlinách mají řadu funkcí. Podílejí se na růstu a reprodukci rostlin a také mají důležitou roli při ochraně proti ultrafialovému záření a škůdcům. Jsou součástí naší stravy a jejich konzumace je spojována s řadou pozitivních účinků. Ve značném množství je najdeme v ovoci a zelenině, ale také v nápojích jako čaj, káva nebo víno. V organismu jsou silně metabolizovány a jejich biologická dostupnost je spíše nízká, například plazmatické koncentrace flavonoidů jsou menší než 1  $\mu\text{M}$ .

Právě flavonoidy jsou z hlediska výzkumu nejvýznamnější podskupinou fenolických látek. Jsou tradičně známé především pro své antioxidační působení, ale spektrum jejich aktivity je značně rozsáhlejší. Mají pravděpodobně protektivní účinky na kardiovaskulární systém a jejich konzumace je podle epidemiologických studií spojena s nižším arteriálním krevním tlakem i nižší incidencí akutního infarktu myokardu a cévní mozkové příhody. Byly u nich popsány také antibakteriální, antivirotické, protizánětlivé, imunostimulační a protinádorové účinky.

Fenolické látky mají schopnost interagovat s ionty biogenních kovů. Přechodné kovy jako železo a měď jsou stopovými prvky, které jsou v lidském organismu součástí řady enzymů a proteinů. Schopnost mědi a železa měnit oxidační stav je zásadní pro jejich biologické funkce, protože umožňuje enzymatické redoxní reakce. Homeostáza těchto kovů je v lidském těle pečlivě regulována. Pokud však dojde k jejímu narušení, ať už genetickými faktory nebo vlivy vnějšího působení, může dojít k toxickému působení těchto kovů. Volné či labilně vázané ionty přechodných kovů mohou působit jako katalyzátory reakcí vedoucích k tvorbě vysoce reaktivních volných radikálů.

Ve zdravém organismu jsou kovové ionty z velké části sekvastrované ve formách neschopných katalyzovat tvorbu volných radikálů. Pokud však dojde k poškození tkání, mohou se volné ionty železa nebo mědi uvolnit. Volné katalytické kovové ionty byly detekovány např. také v aterosklerotických lézích nebo v krevním oběhu po ischemicko-reperfučním poškození.

V chelatačním komplexu fenolické látky a kovového iontu může být přechodný kov redoxně jak neaktivní, tak aktivní, to záleží na funkčních skupinách. V prvním případě se

jedná o vhodné látky pro léčbu možných intoxikací (např. hemochromatóz či Wilsonovy choroby). Pomocí chelátorů můžeme také příznivě ovlivnit dysbalanci přechodných kovů v organismu a zabránit jejich pro-oxidačnímu působení. Pokud je komplex redoxně aktivní, nabízí se možné využití v terapii nádorů, protože nádorové buňky se rychle množí a obsahují tak vyšší množství železa i mědi.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Fenolické látky

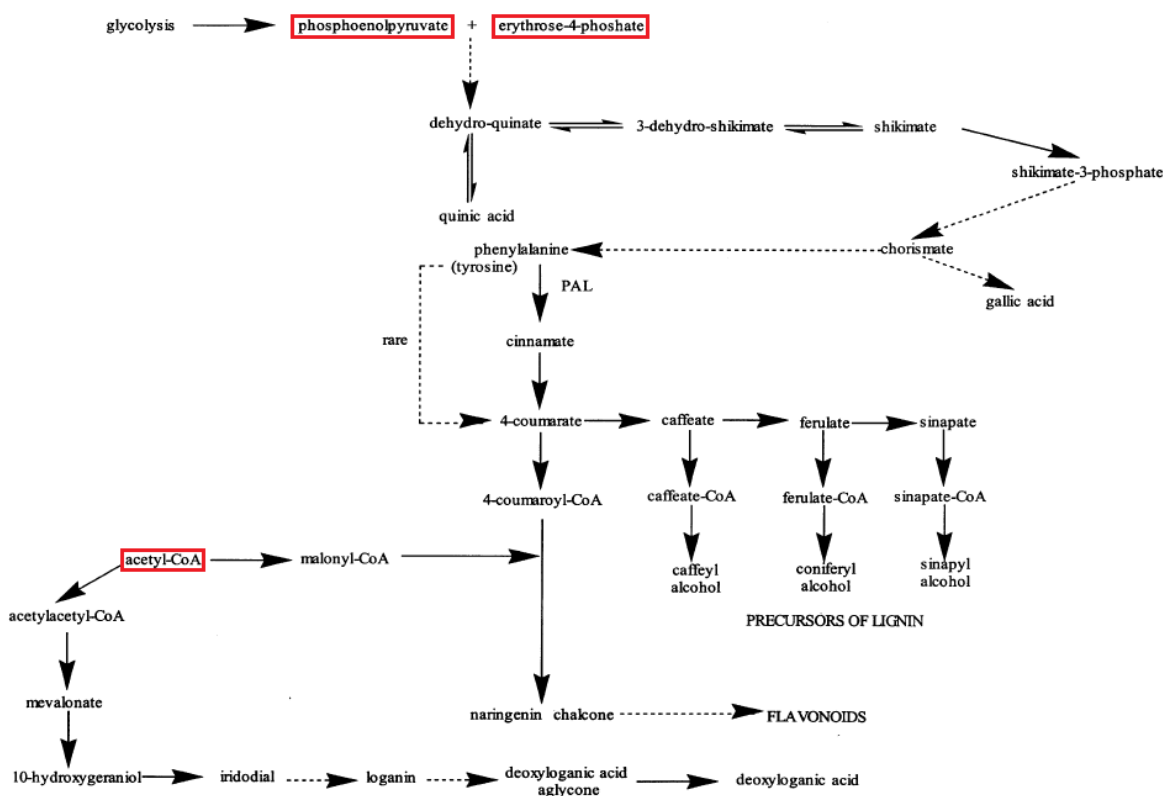
Jako fenolické látky jsou označovány sloučeniny, které mají jeden nebo více aromatických kruhů substituovaných jednou nebo více hydroxylovými skupinami. V rostlinné říši jsou široce rozšířeny a jsou hojně zastoupenými sekundárními metabolity rostlin. Neobvyklé jsou u hub, řas a bakterií. V současnosti je známo více než 8 000 fenolických látek, počínaje od jednoduchých molekul, jako jsou fenolové kyseliny, až po vysoce polymerizované látky, jako jsou taniny [1,2]. Často se pro fenolické látky používá jako synonymní název označení polyfenoly. Tento termín by však měl být používán pouze pro molekuly mající alespoň dva fenolové kruhy [3]. Fenolické látky se podílejí na růstu a reprodukci rostlin. Jako barevné pigmenty v květech a plodech přitahují opylovače a roznašeče semen [4]. Hrají důležitou roli při ochraně rostlin proti škodlivému ultrafialovému záření, škůdcům a parazitům. Způsobují hořkou a svíravou chuť některých plodů a semen, čímž brání rostlinu před predátory [5,6].

Fenolické látky se vyskytují ve všech orgánech rostlin a jsou proto nedílnou součástí lidské stravy. Běžně jsou obsaženy v ovoci a zelenině, obilovinách, luštěninách ale také v nápojích jako jsou džusy, čaj, káva nebo víno. Jsou zodpovědné za chuť, vůni a barvu rostlinné stravy. Chrání potraviny proti nežádoucí oxidaci, čímž prodlužují jejich stabilitu. Jejich konzumace je spojována se sníženým rizikem vzniku chronických onemocnění, jako jsou kardiovaskulární a neurodegenerativní onemocnění, některé druhy rakoviny, diabetes mellitus 2. typu a osteoporóza. Denní příjem se mezi lidmi značně liší, v závislosti na stravovacím režimu, výběru potravin a jejich původu. Zpracováním potravin včetně vaření, fermentace, skladování a pasterizace se obsah fenolických látek snižuje [7].

Jejich biosyntéza může probíhat několika různými způsoby (Obr. 1). Většina přírodních látek obsahujících aromatický kruh pochází z šikimátové metabolické cesty, odvozené od kyseliny šikimové. Látky vznikající tímto způsobem mají hydroxylové skupiny substituované v polohách *ortho*- a *para*-. V prvním kroku reaguje glykolýzou vzniknutý fosfoenolpyruvát s erytroso-4-fosfátem pocházejícím z pentosového cyklu za vzniku kyseliny 2-keto-3-deoxy-7-fosfo-D-araboheptonové. Z té následně intramolekulární cyklizací vzniká první cyklický meziprodukt šikimátové cesty, kyselina 3-dehydrochinová. Její dehydratací vzniká kyselina 3-dehydrošikimová, která je redukována až na kyselinu



šikimovou. Kyselina šikimová je v dalších krocích biosyntézy aktivována na 3-fosfát, který reaguje s fosfoenolpyruvát a postupně je změněna až na kyselinu chorismovou. Zde se dráha větví na metabolické dráhy vedoucí ke vzniku kyseliny gallové a aminokyseliny fenylalaninu, který je substrátem pro syntézu fenylpropanoidů [8,9]. Klíčovým enzymem fenylpropanoidní dráhy, který katalyzuje deaminaci fenylalaninu na kyselinu *trans*-skořicovou je fenylalanin-amoniak lyasa. Následně dochází ke vzniku látek s C6-C3 strukturou [10]. Druhým možným způsobem vzniku je polyketidová metabolická cesta, také známá jako acetátová/mevalonátová cesta. Tato dráha je pokračováním biosyntézy mastných kyselin a vychází z aktivované kyseliny octové (acetylkoenzymu A). Prodlužováním polyketidového řetězce a následnou cyklizací vznikají polycyklické aromatické látky. Tímto mechanismem vzniklé sloučeniny mají hydroxylové skupiny substituované v poloze *meta*-. Při biosyntéze složitějších molekul může docházet ke kombinaci obou těchto metabolických drah [8,11].



**Obr. 1. Znázornění biosyntézy fenolických látek.** Převzato z Ryan *et al.* (2002) [12].

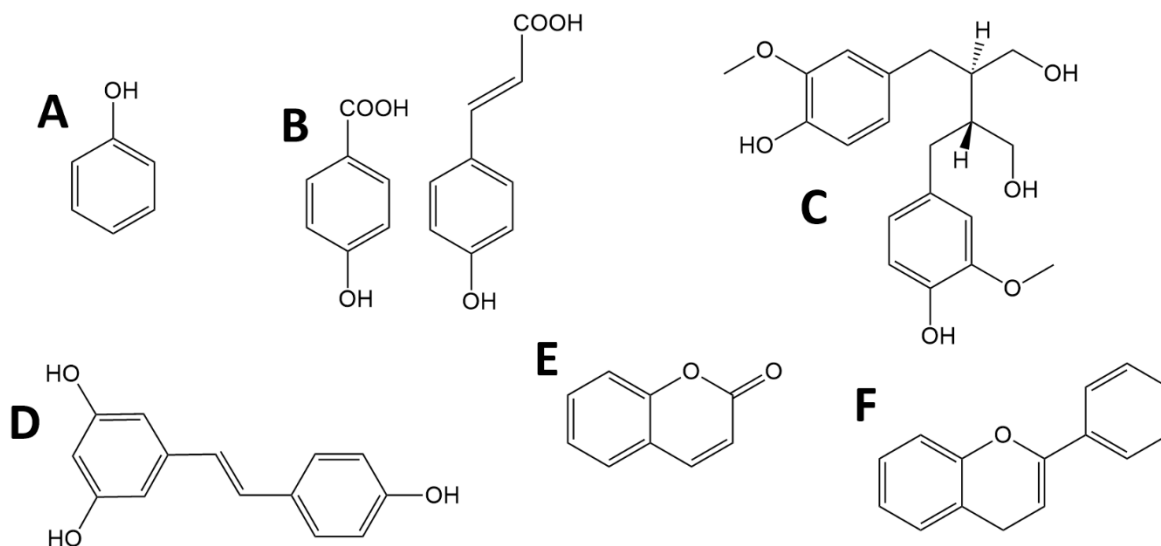
PAL, fenylalanin-amoniak lyasa

Některé fenolické látky jsou široce rozšířené, zatímco jiné jsou specifické pro určitou část nebo je najdeme pouze v určitém rostlinném orgánu nebo vývojovém stádiu [3]. Zatímco flavonol kvercetin je téměř všudypřítomný v rostlinné stravě, například flavanony jsou hlavními zástupci fenolických látek v citrusových plodech [7]. Vyskytují se jak ve volné formě, tak především v konjugované formě s jedním nebo více cukernými zbytky, navázanými většinou přes hydroxylovou skupinou jako O-glykosidy nebo méně často přímo přes uhlík aromatického jádra jako C-glykosidy. Cukerná část může být tvořena jak monosacharidy, disacharidy, tak dokonce i oligosacharidy. Nejběžnějším připojeným cukrem je glukóza, můžeme se však setkat i s galaktózou, rhamnózou, xylózou nebo arabinózou. Dále mohou být připojeny i jiné struktury jako jsou karboxylové a organické kyseliny, aminy a lipidy. Běžné jsou také vazby s dalšími fenoly [5].

Kvůli hydroxylové skupině v molekule těchto látek jsou klasifikovány jako terciární alkoholy. Vlastnostmi jsou podobné alifatickým alkoholům, ale přítomnost aromatického kruhu a atom vodíku fenolické hydroxylové skupiny z nich dělá slabé kyseliny. V rostlinách je najdeme jak v rozpustné, tak nerozpustné formě. Zatímco rozpustné fenolické látky se koncentrují v buněčných vakuolách, nerozpustné se nacházejí v buněčných stěnách [13,14].

Fenolické látky se od 90. let staly oblíbeným předmětem výzkumu, především pro jejich možné pozitivní účinky na lidské zdraví, spojené s jejich konzumací. Toto zdraví prospěšné působení se obecně připisuje jejich pleiotropním účinkům a bylo popsáno v několika preklinických i klinických studiích [7]. Výzkumu těchto látek se věnovalo i několik chemiků oceněných Nobelovou cenou. Mezi nimi byl například Emil Fischer, který studoval látky používané při činění kůží, Richard L. M. Synge, zabývající se o interakce mezi tříslovinami a proteiny nebo Alexander R. Todd a Robert Robinson, kteří společně pracovali na výzkumu anthocyanů a dalších rostlinných barviv. Velký zájem o polyfenoly a jejich působení vedl v roce 1972 k založení mezinárodní společnosti zvané "Groupe Polyphénols". Ta má za cíl podporovat výzkum rostlinných polyfenolů a zároveň poskytovat členům po celém světě jedinečné fórum pro výměnu informací o všech aspektech těchto přírodních látek, od jejich nejzákladnějších chemických vlastností až po jejich použití v potravinářských, zemědělských, farmaceutických a kosmetických vědách a technologiích [2].

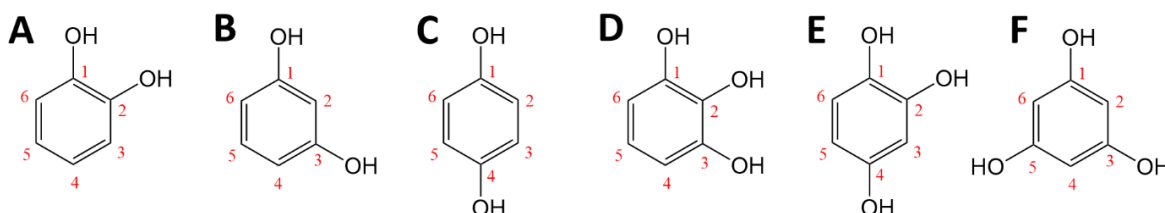
Na základě chemické struktury základního skeletu mohou být fenolické látky rozděleny do několika kategorií. Mezi hlavní skupiny se řadí jednoduché fenoly, fenolické kyseliny, lignany, stilbeny, kumariny a flavonoidy (Obr. 2).



**Obr. 2. Chemické struktury hlavních fenolických látek.** A: jednoduché fenoly, B: fenolické kyseliny, C: lignany, D: stilbeny, E: kumariny, F: flavonoidy.

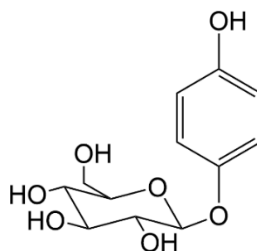
### 2.1.1 Jednoduché fenoly

Mezi jednoduché fenolické sloučeniny můžeme zařadit benzeny s dvěma nebo třemi substituovanými hydroxylovými skupinami (Obr. 3). Příkladem disubstituovaných látek jsou katechol (pyrokatechol), resorcinol nebo hydrochinon. Mezi trisubstituované řadíme pyrogallol, hydroxychinol a floroglucinol [15].



**Obr. 3. Chemické struktury jednoduchých fenolů.** A: katechol (pyrokatechol), B: resorcinol, C: hydrochinon, D: pyrogallol, E: hydroxychinol, F: floroglucinol.

V rostlinách jsou přítomné ve formě aglykonů nebo glykosidů. Zvláště jako aglykony jsou relativně nestabilní. V rostlinných tkáních nejsou zcela běžné. Katechol byl nalezen v listech rostlin druhu *Gaultheria*, zatímco floroglucinol byl objeven jako glykosid ve slupce různých citrusových plodů [2]. Hydrochinon můžeme nalézt ve volném stavu v listech hrušky. Z farmaceutického hlediska je zajímavější jeho glykosid arbutin (Obr. 4). Hojně se vyskytuje v listech, kůře, pupenech nebo plodech mnoha rostlin, hlavně z čeledí Asteraceae, Ericaceae a Rosaceae [8,16]. Používá se především při léčbě infekcí močových cest. Nicméně několik *in vitro* a *in vivo* studií odhalilo i jeho antimelanogenní aktivitu, která může být užitečná při léčbě hyperpigmentace [17].



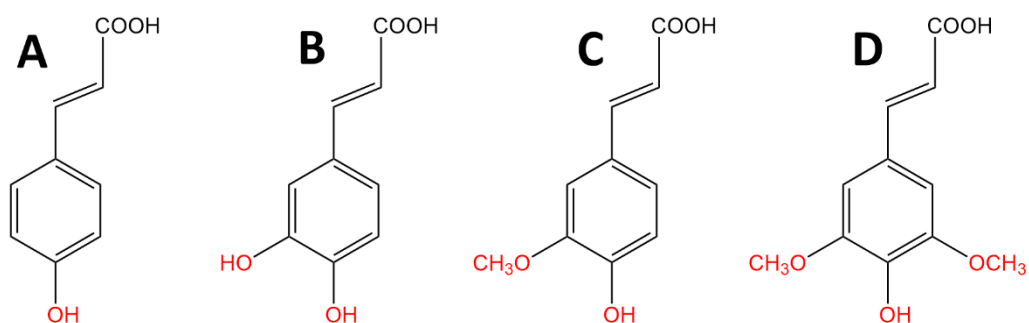
**Obr. 4. Chemická struktura arbutinu.**

## 2.1.2 Fenolické kyseliny

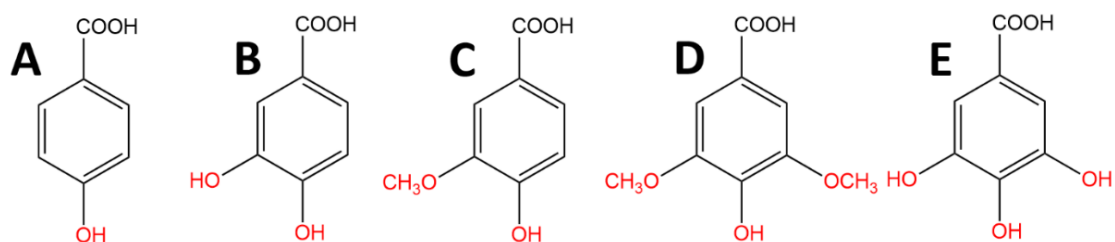
Přírodní fenolické kyseliny dělíme na dvě podskupiny, deriváty hydroxybenzoových kyselin a deriváty hydroxyskořicových kyselin. V rostlinách jsou široce rozšířeny. Vyskytují se v nerozpustné formě jako strukturní složky buněčných stěn, ve volné formě nebo konjugované s estery, ethery a řadou dalších molekul (jednoduché cukry, organické kyseliny nebo rostlinné polymery) [18,19]. V rostlinách mají řadu funkcí, zvyšují příjem živin, podporují klíčení semen při abiotickém stresu a působí jako signální molekuly v obranných reakcích rostlin. V naší stravě jsou hojně zastoupeny. Odhaduje se, že v závislosti na typu stravy jich přijímáme potravou průměrně 25 mg - 1 g denně. Bohatými zdroji jsou ovoce, zelenina, obiloviny, koření, káva nebo čaj [18,20,21].

Mezi nejběžnější hydroxyskořicové kyseliny patří kyselina *p*-kumarová, kávová, ferulová a sinapová (Obr. 5). Ve srovnání s deriváty kyseliny hydroxyskořicové se deriváty kyseliny hydroxybenzoové obecně vyskytují v nižších koncentracích. Najdeme je např. v červeném bobulovitém ovoci, cibuli nebo ředkvích. Řadíme sem kyselinu *p*-hydroxybenzoovou, protokatechovou, vanilovou, syringovou a gallovou (Obr. 6) [13].

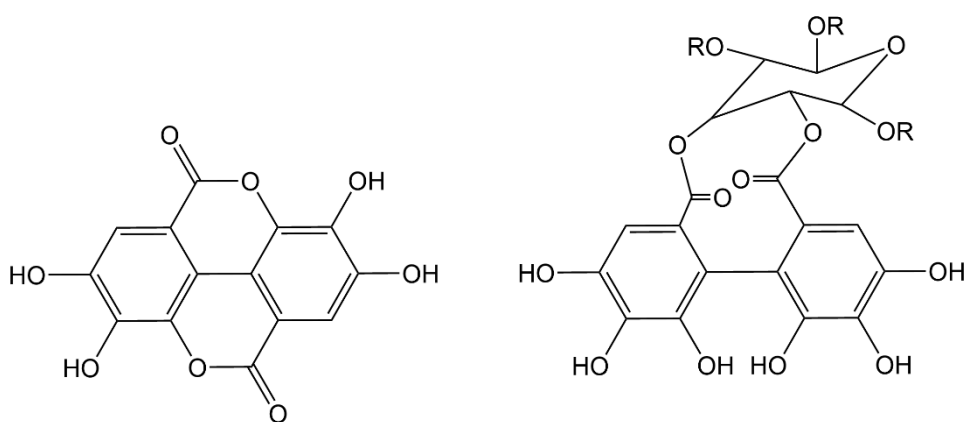
Kyselina gallová je nejčastější fenolická kyselina. Široce se vyskytuje ve formě gallotaninů, což jsou estery s hydroxylovými skupinami sacharidů, jako je glukóza. Dimer kyseliny gallové se jmenuje kyselina ellagová. Od ní odvozené trísloviny nazýváme ellagotaniny (Obr. 7). Ty mohou být buď monomerní, oligomerní nebo C-glykosidické. Mají tendenci tvořit dimery a oligomery o vysoké molekulové hmotnosti. Obsah ellagotaninů v některých potravinách může být velmi vysoký. Sklenice šťávy z granátového jablka, čtyři vlašské ořechy spolu se 100 g malin můžou poskytnout až 400 mg ellagotaninů [22,23].



**Obr. 5. Chemická struktura nejběžnějších derivátů hydroxyskořicové kyseliny.** A: kyselina *p*-kumarová, B: kyselina kávová, C: kyselina ferulová, D: kyselina sinapová.



**Obr. 6. Chemická struktura nejběžnějších derivátů hydroxybenzoové kyseliny.** A: kyselina *p*-hydroxybenzoová, B: kyselina protokatechová, C: kyselina vanilová, D: kyselina syringová, E: kyselina gallová.



**Obr. 7. Chemická struktura kyseliny ellagové a ellagotaniů.**

Předpokládá se, že fenolové kyseliny přispívají k celkovému zlepšení zdravotního stavu, a to především díky svým antioxidačním a protizánětlivým účinkům. Podle dostupných studií pomáhají v prevenci kardiovaskulárních onemocnění a různých druhů rakoviny. Chrání před chorobami způsobenými oxidativním poškozením a vykazují antimikrobiální, antimutagenní, hypoglykemickou a antiagregační aktivitu [24].

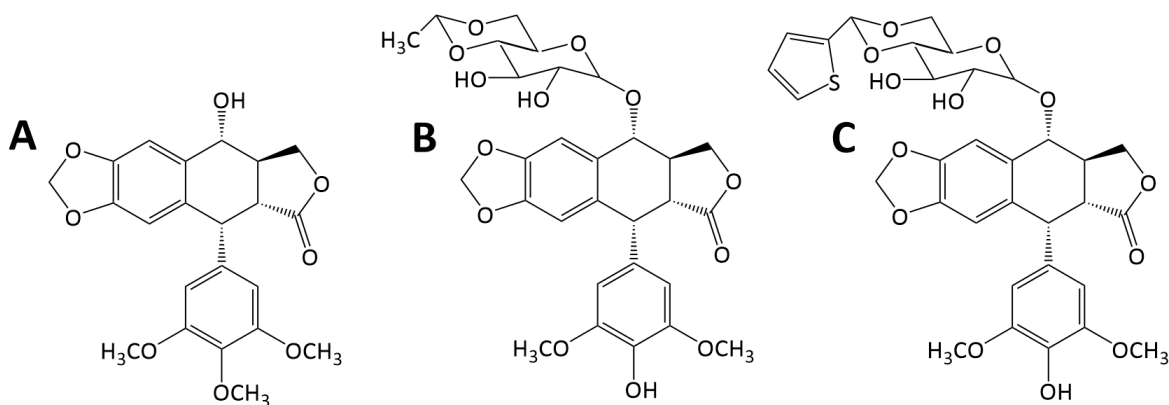
### 2.1.3 Lignany

Lignany jsou sekundární metabolity, které vznikají oxidativní dimerizací dvou nebo více fenyylpropanoidních jednotek. Podle povahy vazby mezi fenyylpropanoidy rozdělujeme lignany na dvě hlavní podskupiny, na klasické lignany a neolignany. Zatímco klasické lignany mají spojení mezi jednotkami v pozicích  $\beta$ - $\beta'$  (také označované jako 8-8'), neolignany mají monomery spojené jakýmkoliv jiným způsobem. Mimo těchto dvou hlavních podskupin, existují ještě dvě menší podskupiny, flavonolignany a kumarolignany.

V rostlinné říši jsou lignany široce rozšířeny. Najdeme je v kořenech, oddencích, stoncích, listech, květech, plodech, semenech i pryskyřicích rostlin. Doposud bylo popsáno více než 200 klasických lignanů a 100 neolignanů. Vyskytují se ve více než 70 čeledích rostlin. Mezi bohaté zdroje patří čeledi Lauraceae, Orchidaceae, Berberidaceae a Schisandraceae. Většina lignanů v rostlinách je ve volném stavu, některé mohou vytvářet glykosidy a další deriváty. Tato skupina sloučenin vykazuje řadu biologických aktivit, včetně protirakovinných, antimikrobiálních, antivirových, imunosupresivních, protizánětlivých, antioxidačních a hepatoprotektivních účinků [25,26].

Lignany se spolu s isoflavonoidy, stilbeny a kumestany řadí mezi tzv. fytoestrogeny, tedy látky, které vykazují estrogení aktivitu. Sekoisolariciresinol a matairesinol jsou lignanové dimery, které samy osobě nejsou estrogeně aktivní. Nejdříve musí dojít k jejich přeměně působením bakterií střevní mikroflóry na aktivní formu, enterodiol a enterolakton. Ty už vykazují estrogení aktivitu. Konzumace stravy bohaté na tyto látky je spojována se sníženým rizikem vzniku rakoviny [27,28].

Asi nejnámějším zástupcem lignanů je v současnosti podofylotoxin. Rostliny rodu *Podophyllum* se pro své léčivé účinky používaly po staletí. Podofylotoxin byl poprvé izolován v roce 1880 z jedné z těchto rostlin. Jedná se o cytotoxickou sloučeninu, která se váže na tubulin, čímž inhibuje polymeraci mikrotubulů během mitózy a přerušuje tak buněčný cyklus. Používá se k topické léčbě genitálních bradavic. Polosyntetické deriváty podofylotoxinu, etoposid a tenoposid (Obr. 8) se používají v léčebné praxi jako cytostatika [26,29].



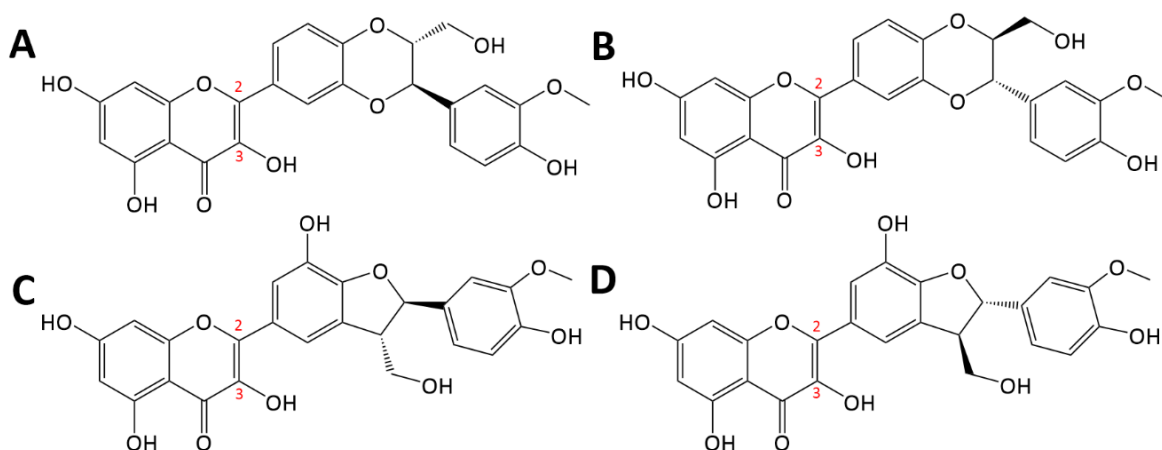
**Obr. 8. Chemická struktura podofylotoxinu a jeho derivátů.** A: podofylotoxin, B: etoposid, C: tenoposid.

V rámci této disertační práce jsem se věnovala několika zástupcům z podskupiny flavonolignanů. Flavonolignany vznikají oxidativním radikálovým spojením koniferylalkoholu s molekulou taxifolinu. Jedná se o přírodní látky, u nichž došlo ke konjugaci lignanové části na flavonoidní skelet. Významný je výskyt těchto látek v nažkách ostropestřce mariánského (*Silybum marianum*, Asteraceae). Ostropestřec mariánský je významnou léčivou rostlinou. Jeho plody se používají již více než 2000 let na onemocnění jater a žlučových cest. Extrakt z ostropestřce, silymarin, stimuluje regeneraci jater a jeho složky působí také antioxidačně a protizánětlivě. Používá se při chronických zánětlivých onemocněních jater, jaterní cirhóze nebo při léčbě otrav mochromůrkou (*Amanita* sp.). Výtažky mají navíc antivirové a protinádorové působení [30,31].

V závislosti na kultivaru rostliny a použité metodě extrakce, obsahuje silymarin několik strukturně příbuzných flavonolignanů. Hlavními složkami jsou silybin A, silybin B, isosilybin A, isosilybin B, silychristin A, silydianin a flavonoid taxifolin. V menší míře tu jsou zastoupeny silychristin B, isosilychristin a 2,3-dehydroflavonolignany, konkrétně 2,3-dehydrosilybin a 2,3-dehydrosilychristin (Obr. 9). Vzhledem k radikálovému mechanismu jejich biosyntézy se flavonolignany, kromě silydianinu, vyskytují jako páry stereoizomerů v různých poměrech. Hlavní flavonolignany jako silybin, isosilybin a silychristin jsou ve formě diastereomerů, zatímco jejich 2,3-dehydroderiváty jsou enantiomery [32].



S ohledem na téma disertační práce bude ještě část týkající se interakcí dehydroflavonolignanů s železem a mědí a jejich antioxidačních a pro-oxidačních vlastností rozvedena níže.

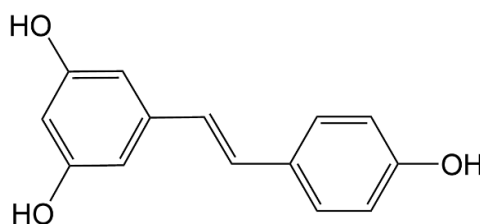


**Obr. 9. Chemická struktura dehydroflavonolignanů.** A: 2,3-dehydrosilybin A, B: 2,3-dehydrosilybin B, C: 2,3-dehydrosilychristin A, D: 2,3-dehydrosilychristin B.

## 2.1.4 Stilbeny

Stilbeny jsou malou skupinou fenylpropanoidů, tvořených 1,2-difenylethylenovým řetězcem neboli dvěma aromatickými kruhy spojenými ethylenovým můstkem. Jedná se o fytoalexiny, které jsou v rostlinách syntetizovány jako obranný mechanismus proti vnějšímu stresu, tím může být napadení patogeny, infekce nebo působení UV záření. Do dneška bylo identifikováno více než 450 těchto sloučenin ve zhruba 45 čeledích a 200 druzích rostlin. Příkladem jsou hrozny (Vitaceae), borovice (Pinaceae), arašídny (Fabaceae) nebo čirok (Poaceae) [33-35]. Stilbeny jsou izomerní sloučeniny a vyskytují se ve dvou formách. *Trans* (*E*)-stilbeny jsou stericky bráněné, zatímco *cis* (*Z*)-stilbeny nejsou stericky bráněné, a tudíž jsou méně stabilní. *E*-stilbeny jsou běžnější. Většina přírodních stilbenů obsahuje fenolové skupiny a ty můžou být jak volné, tak v prenylované, geranylované nebo glykosylované formě [34].

Nejznámějším a také nejprozkoumanějším stilbenem je resveratrol (Obr. 10). Nachází se především ve slupce hroznů, ale najdeme ho také v arašídny, borůvkách nebo brusinkách. V posledních letech byl hojně studován pro své široké spektrum biologických aktivit, jako je modulace buněčné proliferace, angiogeneze, antioxidační aktivita, stimulace lipolýzy adipocytů a potlačení zánětu [35,36]. Velké množství článků se však ukázalo jako podvod a bylo staženo. Tím pověst resveratrolu značně utrpěla [37-39].



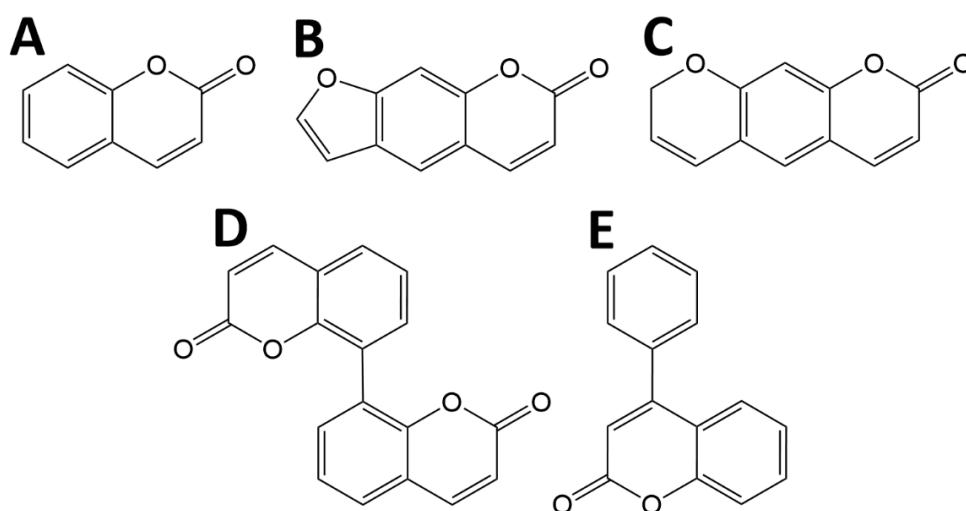
**Obr. 10. Chemická struktura resveratrolu.**

## 2.1.5 Kumariny

Kumariny jsou široce rozšířené sekundární metabolity rostlin, jejichž základní kostra je tvořena benzopyranovým kruhem. Byly identifikovány v řadě rostlin, hub, ale i bakterií. Podle struktury je dělíme především jako jednoduché kumariny, furanokumariny, pyranokumariny, dikumariny a fenylkumariny (Obr. 11). V posledních několika desetiletích byly objektem rozsáhlého fytochemického a farmakologického výzkumu. Prokázala se u nich protizánětlivá, antikoagulační, antiagregační, antimikrobiální, protirakovinná, antioxidační a neuroprotektivní aktivita [40-42].

V současnosti je známo asi 1300 kumarinových derivátů. Ve větším množství se vyskytují pouze v čeledích Fabaceae, Apiaceae, Asteraceae a Rutaceae [8]. Kumariny jsou pojmenovány podle rostliny *Coumarouna odorata* (nyní *Dipteryx odorata*, česky silivoň obecný), ze které byl v roce 1820 poprvé izolován nejjednodušší zástupce této skupiny, kumarin. Mezi další významné zástupce se řadí dikumarol, umbeliferon, herniarin, eskuletin, psoralen a imperatorin [41,43].

Studiem kumarinů a jejich interakcemi s biogenními kovy se v minulých letech naše skupina již zabývala. Farmakologické působení těchto látek bylo shrnuto v několika publikacích [44-47].

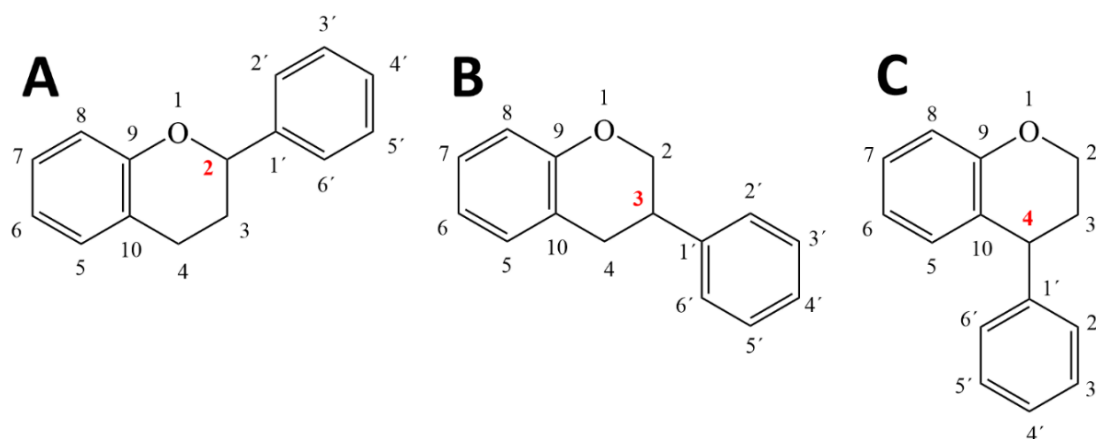


**Obr. 11. Základní chemické struktury kumarinů.** A: jednoduchý kumarin, B: furanokumarin, C: pyranokumarin, D: dikumarin, E: fenylkumarin.

## 2.1.6 Flavonoidy

Flavonoidy jsou polyfenolické látky hojně se vyskytující v celé rostlinné říši. Patří mezi sekundární metabolity rostlin a v přírodě jsou univerzálně rozšířeny. Bakterie a houby je netvoří. V současné době bylo izolováno a identifikováno kolem 6000 těchto sloučenin. Nacházejí se ve všech rostlinných tkáních, kde jsou přítomny uvnitř buněk nebo na povrchu různých rostlinných orgánů. V rostlinách jsou flavonoidy často přítomny jako *O*- nebo *C*-glykosidy. *O*-glykosidy mají sacharidové substituenty vázané k hydroxylové skupině aglykonu, obvykle umístěné v poloze 3 nebo 7, zatímco *C*-glykosidy mají cukerné jednotky vázané k uhlíku aglykonu, obvykle na C6 nebo C8. Nejběžnějšími sacharidy jsou rhamnóza, glukóza, galaktóza a arabinóza. Často se také vyskytují flavonoidní diglykosidy [48-51].

Jedná se o deriváty difenylpropanu. Struktura flavonoidů se skládá ze dvou benzenových kruhů (A a B), které jsou spojeny heterocyklickým kruhem obsahujícím kyslík (C). Podle napojení aromatického kruhu na heterocyklický kruh se dělí na flavonoidy (2-fenylchromany), isoflavonoidy (3-fenylchromany) a neoflavonoidy (4-fenylchromany) (Obr. 12). Na základě stupně oxidace a nasycení heterocyklického kruhu C lze flavonoidy dělit na flavanoly, flavanony, flavony, isoflavony, flavonoly a anthocyanidiny (Obr. 13) [48,49].



**Obr. 12. Základní chemické struktury flavonoidů se zacykleným tříuhlíkatým spojovacím řetězcem. A: flavonoidy, B: isoflavonoidy, C: neoflavonoidy.**

Flavonoidy přijímáme jako součást naší potravy. Hlavními zdroji jsou ovoce a zelenina, nápoje (červené víno, káva, čaj), kakaové boby, sójové produkty nebo léčivé rostliny. Příjem potravin obsahujících flavonoidy se může lišit v závislosti na stravovacích zvyklostech v různých zemích. Průměrně přijímáme asi 1 g flavonoidů denně, z toho 16-25 mg kvercetin. Jejich konzumace je tradičně spojována s řadou pozitivních účinků. Flavonoidy vykazují protirakovinové, antioxidační, protizánětlivé a antivirové vlastnosti. Mají také neuroprotektivní a kardioprotektivní účinky. Některé tyto účinky mohou být dány i modulací aktivity enzymů. Flavonoidy jsou totiž účinnými inhibitory několika enzymů, jako je xanthinoxidasa, cyklooxygenasa, NADPH-oxidasa, lipoxygenasa nebo fosfatidylinositol-3-kinasa [50,52,53].

### Flavony

Flavony jsou široce rozšířeny, najdeme je v listech, květech a plodech rostlin. Mezi hlavní zdroje flavonů patří celer, petržel, červená paprika, heřmánek, máta a *Ginkgo biloba*. Nejrozšířenějšími aglykony jsou apigenin a luteolin. Významnými zástupci jsou také baikalein, baikalin, diosmin a chrysin. V lidské potravě je ale relativně málo flavonů v porovnání s jinými typy flavonoidů. Kůra citrusových plodů je bohatým zdrojem polymethoxylovaných flavonů, jako je tangeretin, nobiletin a sinensetin. Mají dvojnou vazbu mezi polohami 2 a 3 a ketonovou skupinu v poloze 4 kruhu C. Většina flavonů přijímaných z ovoce a zeleniny má hydroxylovou skupinu v poloze 5 kruhu A. Hydroxylace v jiných polohách, většinou v poloze 7 kruhu A nebo 3' a 4' kruhu B, se může lišit podle taxonomického zařazení konkrétních rostlin [51,52].

### Flavonoly

Flavonoly se hojně vyskytují v různých druzích ovoce a zeleniny. Nejvíce studovanými flavonoly jsou kaempferol, kvercetin, myricetin a fisetin. Bohatými zdroji jsou cibule, kapusta, hlávkový salát, rajčata, jablka a hroznové víno. Zdrojem flavonolů je kromě ovoce a zeleniny také čaj a červené víno. Příjem flavonolů je spojen s širokou škálou možných pozitivních účinků, které zahrnují antioxidační potenciál a snížené riziko cévních onemocnění. Ve srovnání s flavony mají flavonoly hydroxylovou skupinu v poloze 3 kruhu C, která může být glykosylována [52]. Nejrozšířenějším a také nejvíce popsaným flavonoidem je kvercetin. Vyskytuje se především ve formě glykosidu, jako je rutin.

Kvercetin a rutin se v mnoha zemích používají jako vazoprotektiva a také jako součást mnoha multivitaminových doplňků stravy a bylinných přípravků [54].

### Flavanony

Flavanony jsou podskupinou flavonoidů, která se v naší stravě vyskytuje téměř výhradně v citrusových plodech. V menší míře je můžeme nalézt v rajčatech a některých aromatických bylinách jako je máta. V citrusových plodech tvoří flavanony přibližně 95 % celkových flavonoidů. Hlavními zástupci jsou hesperetin, naringenin a eriodictyol. Tyto sloučeniny jsou zodpovědné za hořkou chuť šťávy a kůry citrusových plodů. Mají antioxidační a protizánětlivé účinky a snižují krevní lipidy a cholesterol. Flavanony, také nazývané dihydroflavony, mají kruh C nasycený a na rozdíl od flavonů neobsahují dvojnou vazbu mezi polohami 2 a 3 [52,55].

### Flavanoly

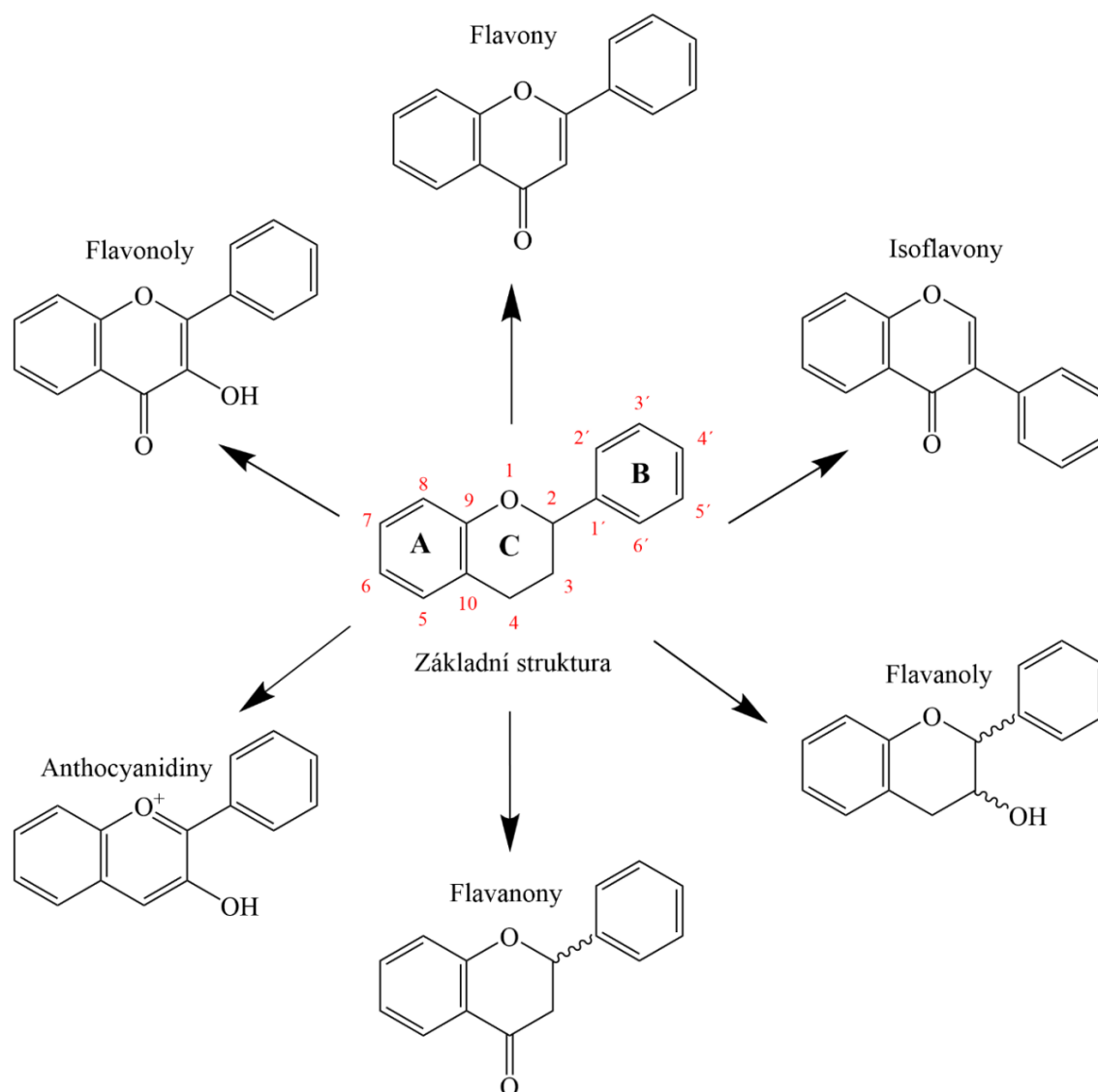
Flavanoly jsou také označovány jako katechiny nebo flavan-3-oly, protože hydroxylová skupina je vždy vázána na pozici 3 kruhu C. Mezi pozicemi 2 a 3 nemají dvojnou vazbu. Kvantitativně představují flavanoly hlavní skupinu flavonoidů ve stravě ve vyspělých zemích. Mezi hlavní zdroje patří čokoláda, kakao, jablka a čaj. Nejznámějšími zástupci jsou katechin, epikatechin a epigalokatechin galát [52,56].

### Anthocyanidiny

Anthocyanidiny jsou rostlinné pigmenty zodpovědné za modrou, fialovou, červenou nebo oranžovou barvu květů, listů a plodů. Jejich barva závisí na pH a také na methylaci nebo acylaci hydroxylových skupin na kruzích A a B. Převládají u krytosemenných rostlin, ale jejich výskyt byl popsán i u nahosemenných. Tato skupina látek je rozpustná ve vodě a běžně se vyskytuje ve formě glykosidů. Nejvýznamnějšími zástupci jsou cyanidin, pelargonidin, delphinidin, peonidin, petunidin a malvidin. Vyskytují se převážně ve vnějších buněčných vrstvách různých druhů ovoce. Vysoké množství anthocyanidinů mají například brusinky, borůvky, maliny, jahody, ostružiny, švestky, hroznové víno, třešně a sladké brambory [51,52].

## Isoflavony

Isoflavony jsou významnou podskupinou flavonoidů, která je v rostlinné říši distribuována pouze v omezené míře. Hlavním potravinovým zdrojem isoflavonů je sója a výrobky ze sojových bobů, které obsahují především daidzein a genistein. Mají estrogení a/nebo antiestrogení účinky. Isoflavony tak mohou být použity jako alternativní terapie pro širokou škálu hormonálních poruch, včetně několika typů rakoviny, kardiovaskulárních onemocnění, osteoporózy nebo symptomů menopauzy. Na druhou stranu lze isoflavony považovat i za endokrinní disruptory s možnými negativními vlivy na zdravotní stav určité části populace nebo na životní prostředí [57].



**Obr. 13. Základní chemické struktury flavonoidních sloučenin.**

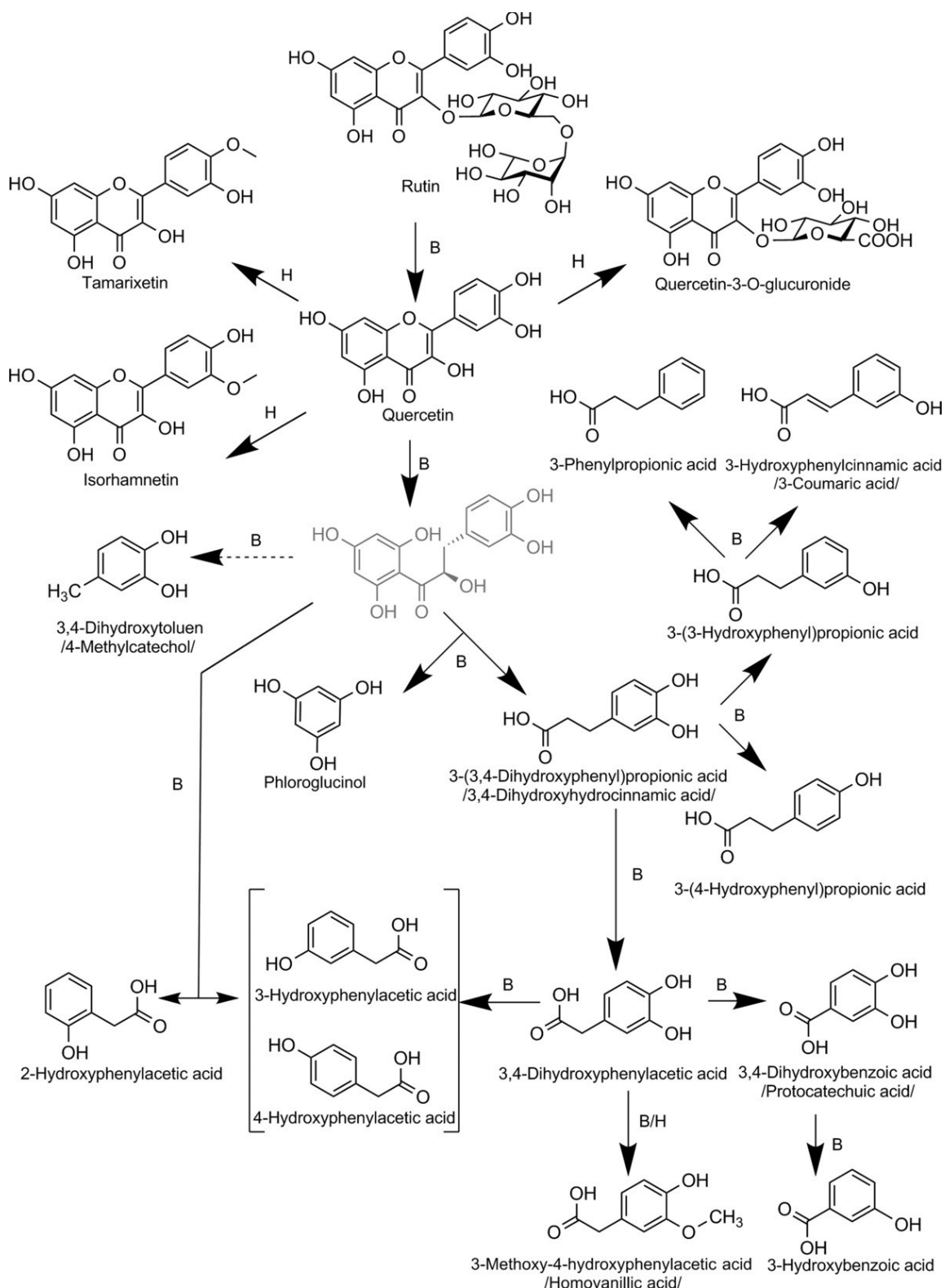
### 2.1.6.1 Metabolismus flavonoidů

Flavonoidy jsou v lidském organismu masivně metabolizovány ještě před vstupem do systémového oběhu. K tomu dochází již v buňkách tenkého střeva. Následně jsou metabolity flavonoidů vázány na albumin a transportovány do jater portální žílou, kde dochází k jejich další metabolizaci. Metabolity vznikající v játrech mohou být transportovány do cílových buněk nebo mohou podstoupit enterohepatální oběh skrze vyloučení žlučí. Případně mohou být vyloučeny z organismu i močí. V tenkém střevě nezmetabolizované flavonoidy a jejich metabolity, které nebyly absorbovány v tenkém střevě, se dostanou do tlustého střeva, kde enzymy střevní mikroflóry štěpí 1) lidskými enzymy nerozštěpitelné glykosidy (jako rutin) na aglykony a 2) aglykony na jednoduché fenolové kyseliny nebo jiné fenolické deriváty. Ty se principiálně dobře absorbují a dosahují obecně vyšších koncentrací v plazmě než parentní flavonoidy. Řada těchto fenolických látek je následně také metabolizována v játrech. Nejčastějšími metabolickými reakcemi v jejich případě jsou *O*-methylace, a konjugace za vzniku sulfátů nebo glukuronidů [48,58]. Příkladem složitěho metabolismu je kvercetin (Obr. 14).

Biologická dostupnost flavonoidů se liší u jednotlivých zástupců, ale obecně je nízká. Absorpce z tenkého střeva je obecně účinnější než z tlustého střeva a je hlavním místem limitované absorpce flavonoidů. Konjugační reakce, ke kterým dochází již v tenkém střevě po absorpci, jsou velmi účinné. V důsledku toho nelze většinou v plazmě ani moči nalézt žádné volné flavonoidní aglykony, s výjimkou katechinů. Plazmatické koncentrace flavonoidů po příjmu normální stravy jsou nižší než 1  $\mu\text{M}$  [59].

Isoflavony jsou nejlépe vstřebatelné dietní flavonoidy. Flavanoly, flavanony a flavanolové glykosidy se vstřebávají se střední účinností, zatímco proanthocyanidiny, galáty a anthocyany se vstřebávají nejhůře. Je však zřejmé, že vstřebávání flavonoidů z potravy ovlivňuje matrice, ve které jsou konzumovány. Pokud jsou přijímány s potravinami s vyšším obsahem tuku, je následně v moči detekováno vyšší množství flavonoidních metabolitů. Absorpce je také ovlivněna dávkováním, předchozí stravou, rozdíly mezi pohlavími, genetickými vlastnostmi a složením mikrobiální flóry tlustého střeva [48].





**Obr. 14. Metabolismus nejběžnějšího flavonoidu kvercetinu.** Převzato z Najmanová *et al.* (2016) [60].

Schéma znázorňuje potvrzené i domnělé metabolity kvercetinu. Struktura v šedé barvě nebyla doposud nalezena. B: metabolity tvořené střevní mikroflórou v tlustém střevě, H: metabolity tvořené lidskými enzymy.

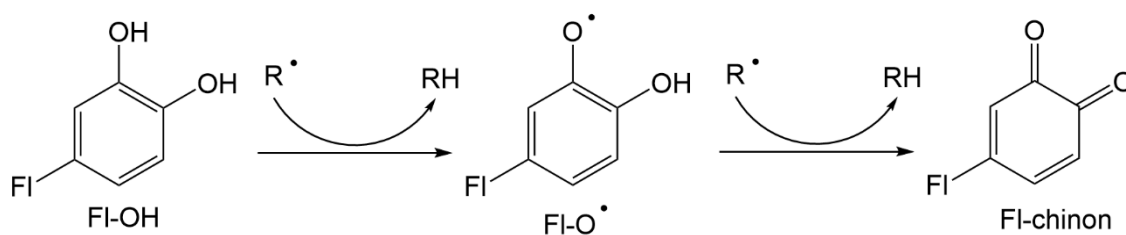
### 2.1.6.2 Antioxidační působení flavonoidů

Podle definice jsou antioxidanty látky, které i přestože jsou přítomny v nízké koncentraci ve srovnání s koncentrací oxidovatelného substrátu v médiu, mohou inhibovat jeho oxidaci. Podle této definice by flavonoidy, které chrání před oxidací buněčné komponenty, měly být považovány za přírodní antioxidanty [61]. Antioxidační schopnosti mnoha flavonoidů jsou mnohem silnější než vitamínů C a E. Například jednoelektronový redukční potenciál epigalokatechin galátu za standardních podmínek je 550 mV, což je hodnota nižší než u glutathionu (920 mV) ale srovnatelná s  $\alpha$ -tokoferolem (480 mV) [62].

Oxidační stres je stav přítomný ve všech aerobních organismech. Dochází k němu, pokud produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) překročí kapacitu antioxidačního systému organismu. Oxidační stres hraje klíčovou roli při vzniku a rozvoji mnoha chorob spojených se zánětem, jako jsou neurodegenerativní a kardiovaskulární onemocnění nebo rakovina. Na druhé straně vyvážená tvorba ROS je součástí některých fyziologických procesů, např. fagocyty produkují ROS prostřednictvím systému NADPH-oxidasy jako součást jejich obranného mechanismu proti patogenům [63].

ROS jsou obvykle velmi reaktivní, nestálé a nemohou být v organismu transportovány na velké vzdálenosti. Poškozují tedy buněčné struktury, které jsou nejbližší místu jejich vzniku. Snadno napadají nukleové kyseliny, proteiny nebo lipidy [63]. Flavonoidy mohou zabránit poškození způsobenému volnými radikály několika mechanismy.

Flavonoidy jsou schopny vychytávat volné radikály přímo darováním atomu vodíku. Radikály jsou deaktivovány podle následující rovnice, kde  $R\bullet$  je volný radikál a  $Fl-O\bullet$  je flavonoidní fenoxylový radikál (Obr. 15). Antioxidační aktivita flavonoidů *in vitro* závisí na uspořádání funkčních skupin na jádrové struktuře. Jak konfigurace, tak celkový počet hydroxylových skupin podstatně ovlivňují mechanismus antioxidační aktivity. Hydroxylová konfigurace na kruhu B je nejvýznamnější pro vychytávání ROS, zatímco substituce kruhů A a C má malý vliv na vychytávání radikálů superoxidových aniontů [62,64].



**Obr. 15. Vychytávání reaktivních forem kyslíku flavonoidy.**

Volný radikál může reagovat s druhým radikálem za vzniku stabilní chinonové struktury [64].

Dalším mechanismem, kterým flavonoidy mohou působit, jsou interakce s různými antioxidačními enzymy. Někdy se může jednat o kombinaci vychytávání radikálů a interakce s funkcemi enzymů. Flavonoidy jsou schopny indukovat detoxikační enzymy fáze II (např. NAD(P)H: chinon oxidoreduktasu, glutathion S-transferasu, a UDP-glukuronosyltransferasu), což jsou hlavní obranné enzymy proti elektrofilním toxickým látkám a oxidačnímu stresu fáze II [62].

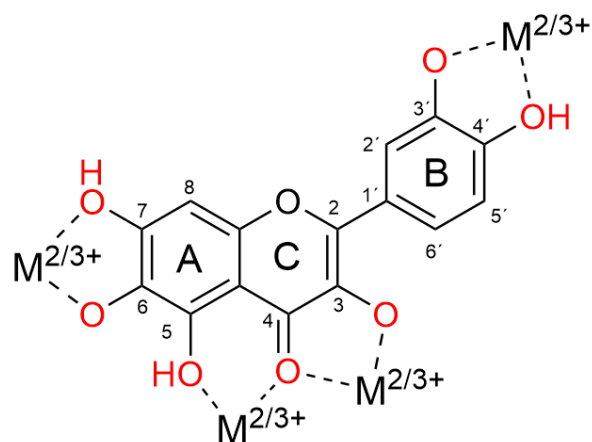
Flavonoidy také inhibují enzymy zodpovědné za produkci superoxidového radikálu ( $O_2^{\bullet-}$ ), jako je xantinoxidasa a proteinkinasa C. Bylo také prokázáno, že flavonoidy inhibují cyklooxygenasu, lipoxygenasu, mitochondriální sukcinoxidasu a NADPH-oxidasu, které se všechny podílejí na produkci ROS. NADPH-oxidasa je systém spojený s membránou katalyzující produkci  $O_2^{\bullet-}$  v aktivovaných neutrofilech [62,64].

V neposlední řadě je pro antioxidační působení flavonoidů důležitá jejich schopnost chelátovat ionty přechodných kovů. Volné ionty železa (lat. *ferrum*, Fe) a mědi (lat. *cuprum*, Cu), jsou-li v redukované formě, můžou spouštět Fentonovu reakci (Rov. 1), kdy dochází k redukci peroxidu vodíku za vzniku vysoce toxického hydroxylového radikálu. Klasická Fentonova reakce probíhá s  $Fe^{2+}$ , ale na jeho pozici může být i  $Cu^+$ , reakce pak probíhá stejně, jen vzniká  $Cu^{2+}$ .



Vyvážením nadměrného množství těchto iontů dochází k zabránění jejich účasti na produkci ROS, které následně poškozují buňky lidského těla. Vazebnými místy pro chelataci kovů (Obr. 16) jsou v molekule flavonoidů katecholová část na kruhu B, dále 3-hydroxyskupina spolu s 4-ketoskupinou na heterocyklickém kruhu C, 5-hydroxyskupina s 4-ketoskupinou mezi kruhem A a C a hydroxylové skupiny v polohách 6 a 7 na kruhu A [65].

Chelatační schopnost kvercetinu byla popsána již s velkým množstvím kovových iontů, jako jsou Mo(VI), Fe(II)/Fe(III), Cu(I)/Cu(II), Zn(II), Al(III), Tb (III), Pb(II) nebo Co(II) [66].



Obr. 16. Vazebná místa struktury flavonoidů pro kovové ionty.

### 2.1.6.3 Pro-oxidační působení flavonoidů

Stejně jako jiné antioxidanty, také flavonoidy mohou za určitých okolností působit jako pro-oxidanty a tím podporovat oxidaci jiných sloučenin. Možné pro-oxidační účinky flavonoidů se mohou projevit *in vivo*, pokud se do oxidačních procesů zapojí volné ionty přechodných kovů. Flavonoidy jsou totiž kromě chelatace schopny i redukce Cu(II) na Cu(I) nebo Fe (III) na Fe (II) a umožňují tak tvorbu iniciačních radikálů [62]. Mechanismus probíhá podle Haber-Weissovy reakce (Rov. 2 a 3), v podstatě jde opět o Fentonovu reakci, jen místo zabránění účasti katalyzátoru dochází naopak k jeho obnově. V přítomnosti  $O_2^{\bullet-}$  nebo redukčního činidla se měďnaté nebo železité ionty redukují a ionty v nižším valenčním stavu jsou schopny katalyzovat tvorbu hydroxylových radikálů ( $OH^{\bullet}$ ) z peroxidu vodíku [67].



Ve zdravém organismu jsou kovové ionty z velké části sekvastrované ve formách neschopných katalyzovat reakce volných radikálů (např. ve feritinu nebo ceruloplasminu) [62]. Pokud však dojde k poškození tkání můžou se uvolnit volné ionty železa a/nebo mědi. Také v aterosklerotických lézích nebo v krevním oběhu po ischemicko-reperfúzním poškození byly naměřeny katalyticky aktivní kovové ionty. V těchto případech se pak může projevit potenciál flavonoidů působit jako pro-oxidanty [68,69]. Zda dojde k antioxidačnímu nebo pro-oxidačnímu působení záleží na více faktorech, mj. pH, které se např. při zmíněném ischemicko-reperfúzním poškození snižuje a zvyšuje se tak pravděpodobnost pro-oxidačního působení.

K hodnocení antioxidačního či pro-oxidačního působení flavonoidů se používá měření vlivu na hemolýzu červených krvinek vyvolanou kovy v přítomnosti a nepřítomnosti testovaných látek. Membrána červených krvinek je nejpoužívanějším modelem pro studium oxidativního poškození biomembrán. Jako většina membrán hraje zásadní roli při udržování buněčné homeostázy. Červené krvinky jsou vystaveny neustálému působení oxidačního stresu během jejich normálních aerobních funkcí. U zdravých jedinců je tento stres vyvážen silnou a účinnou enzymatickou a neenzymatickou antioxidační obranou. Červené krvinky jsou zvláště náchylné k oxidaci kvůli jejich vysokému obsahu polynenasycených lipidů, jejich bohatému zásobení kyslíkem a přítomnosti přechodných kovů, jako je Fe a Cu [66].

## 2.2 Biogenní kovy

Lidské tělo pro svou správnou funkci potřebuje 23 prvků, mezi nimi je i několik kovových prvků. Kovy jako Na, K, Mg, Ca, Fe, Mn, Co, Cu, Zn a Mo jsou nezbytnými prvky pro život a náš organismus jich musí mít přiměřené množství. Prvky nezbytné pro správné fungování můžeme rozdělit na makroprvky a stopové prvky neboli mikroprvky. Makroprvky se v těle vyskytují v koncentraci vyšší než 1 µg/g tkáně (Obr. 17). Nejzastoupenějším biogenním kovem je Ca. Hned po organických prvcích jako je O, C, H a N je na pátém místě v množství obsaženém v lidském těle. Dalšími nejvíce zastoupenými kovy jsou K, Na a Mg, ty řadíme mezi makroprvky. Všechny ostatní biogenní kovy jsou přítomny v menším množství a označujeme je jako mikroprvky neboli stopové prvky [70,71].

Group	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Period																		
1	H																	He
2	Li	Be											B	C	N	O	F	Ne
3	Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar
4	K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
5	Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
6	Cs	Ba	L	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
7	Fr	Ra	A															

**Obr. 17. Periodická tabulka prvků nacházejících se v lidském těle.** Převzato z Fraga (2005) [71]. Biogenní prvky (bílé pozadí), stopové prvky (černé písmo).

Biogenní kovy a jejich sloučeniny mají v organismu řadu funkcí. Jsou složkou několika metaloenzymů, účastní se na degradaci, tvorbě nebo metabolismu organických sloučenin, podílí se na přenosu nervových vzruchů do mozku a z mozku. Přechodné kovy jako železo a měď jsou nezbytné pro všechny organismy, které uskutečňují oxidativní metabolismus a spolu se zinkem představují tři nejhojnější stopové kovy v lidském mozku. Schopnost mědi a železa měnit oxidační stav je zásadní pro jejich biologické funkce. Působí

jako důležité složky četných enzymů, které se účastní redoxních reakcí. Jak bylo ale zmíněno v předchozí kapitole, redoxně aktivní přechodné kovy mohou mít i toxické účinky a podílet se na produkci ROS. Proto je jejich homeostáza v lidských tkáních přísně regulována [70,72].

Porušení homeostázy přechodných kovů může vést ke vzniku řady patologických stavů. V případě ztráty rovnováhy kovů dochází k jejich nadměrnému hromadění v těle, příkladem jsou hereditární a sekundární hemochromatóza nebo Wilsonova choroba, nebo naopak k jejich nedostatku jako u Menkesova syndromu. Pokud dojde k určité dysbalanci kovů, tak se může projevit jejich škodlivé působení. Základem těchto toxických účinků je navození oxidačního stresu, což jak bylo popsáno výše je ztráta rovnováhy mezi tvorbou ROS a antioxidačními obrannými mechanismy organismu. Kovy jsou také schopny interagovat s jadernými proteiny a DNA, což způsobuje oxidační poškození biologických makromolekul. K léčbě patologických stavů spojených s nadbytkem nebo nadměrnou akumulací kovů v těle se používá chelatační terapie [73,74].

Termín chelatace pochází z řeckého slova χηλή (khēlē), což znamená klepeta. Patologické stavy spojené s nadbytkem nebo akumulací kovu v organismu stejně tak jako akutní a chronické intoxikace kovy lze léčit se značnou účinností podáváním příslušných chelátorů. Vývoj nového chelatačního činidla je založen na kombinaci chemických *in vitro* experimentů s pokusy na zvířecích modelech, zaměřených na kinetiku a dynamiku jak kovů, tak chelátorů, s následnými klinickými zkouškami a sledováním vylučování kovu a stavu poškození tkáně [73]. Typicky se chelatační terapie v klinické praxi používá při Wilsonově chorobě a transfuzním přetížení železem (zmíněné sekundární hemochromatóze). V obou případech je tento přístup zcela zásadní a prodlužuje život pacientů [74,75]. Tato terapie však nevede jen k vyvážení nadbytečného kovu a jeho odstranění z těla. Chelatační činidla mohou také působit jako chaperony a ovlivňovat distribuci i jiných kovů v organismu [76].

Mezi používané chelátory mědi patří D-penicilamin nebo triethylentetramin [74]. Klinicky používanými chelátory železa jsou deferoxamin, deferipron, deferasirox a dexrazoxan [77,78]. Několik dalších skupin látek s potenciálně chelatačním účinkem je předmětem výzkumu.

Tato disertační práce nemohla zahrnout všechny biogenní kovy a je založen především na třech mikrobiogenních prvcích: železe, mědi a kobaltu.

### 2.2.1 Železo

Železo je důležité pro téměř všechny živé organismy a účastní se celé řady metabolických procesů. Jako přechodný kov je nezbytné pro přenos elektronů. Také pro transport kyslíku, mitochondriální dýchání, inaktivaci škodlivých ROS a syntézu DNA. Pro jeho transport a skladování byly v živých organismech vyvinuty účinné mechanismy [75]. Koncentrace železa v tělesných tkáních musí být přísně regulována, protože nadměrné množství železa vede k poškození tkání v důsledku tvorby ROS. Poruchy kinetiky železa patří k častým onemocněním a zahrnují široké spektrum projevů od anémie k přetížení železem až k neurodegenerativním chorobám [79].

Celkové množství železa u 70 kg člověka je asi 3500–4000 mg, což odpovídá průměrné koncentraci 50–60 mg železa na kg tělesné hmotnosti. Naprostá většina železa se nachází v hemoglobinu erytrocytů. Asi desetina celkového železa je přítomna v myoglobinu svalů, v enzymech a cytochomech. Zbytek se nachází v makrofázích retikuloendoteliálního systému (RES) a hepatocytech ve formě feritinu a také v kostní dřeni [80].

Významnou roli při vstřebávání železa z potravy hraje duodenum. Absorbované železo může být uloženo v enterocytech nebo vstoupit do oběhu. Po těle je transportováno vázané na plazmatický protein transferin. Poté je přijímáno tkáněmi a využíváno pro mnoho procesů, jako je erythropoéza v kostní dřeni, syntéza myoglobinu ve svalech a oxidační metabolismus. Makrofágy sleziny, jater a kostní dřene, které patří do RES, mají za úkol recyklovat železo ze senescentních erytrocytů. Játra mají důležitou zásobní a regulační funkci. Produkci hormonu hepcidinu řídí uvolňování železa z enterocytů a makrofágů do oběhu. První funkce je klíčová pro regulaci absorpce železa (Obr. 18). Obecně tyto mechanismy umožňují jemnou regulaci a udržování plazmatických koncentrací železa ve fyziologických hladinách [80]. Plazmatické hladiny hepcidinu jsou regulovány různými stimuly, včetně cytokinů, plazmatických hladin železa, anémií a hypoxií. Dysregulace exprese hepcidinu má za následek poruchy homeostázy železa. Nadměrná exprese hepcidinu vede k anémii, zatímco nízká produkce hepcidinu vede k hereditární hemochromatóze s následnou akumulací železa v životně důležitých orgánech [81].

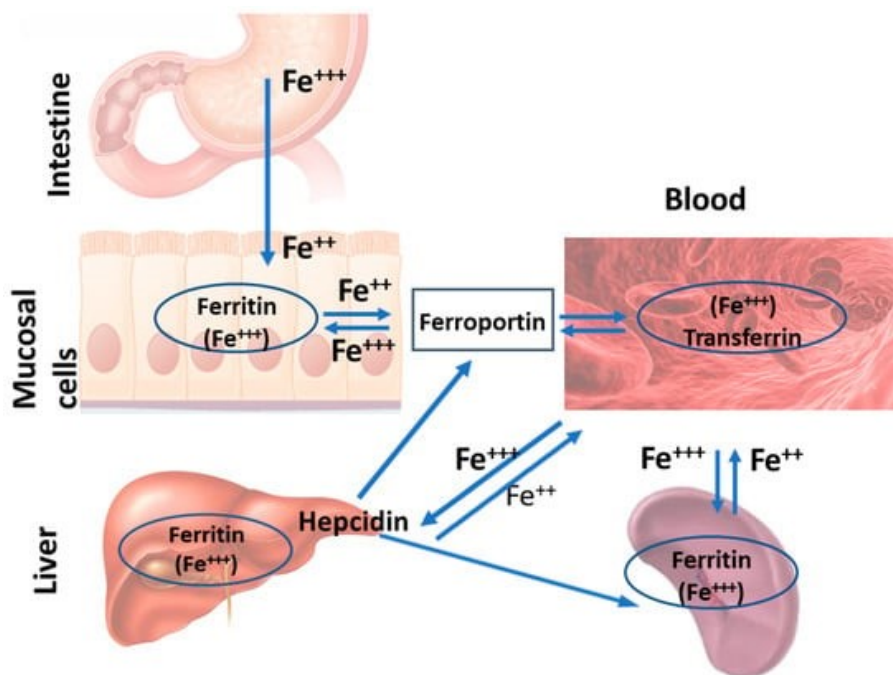
I když je množství železa vázaného na transferin menší než 1 % (přibližně 4 mg) celkové tělesné zásoby železa, jedná se o jeho nejvýznamnější, rychle využitelnou



zásobárnu. Obrat železa vázaného na transferin je asi 25 mg/den. Z toho je 80 % železa transportováno do kostní dřeně pro syntézu hemoglobinu ve vyvíjejících se erytroidních buňkách. Následně se retikulocyty uvolňují do oběhu a během jednoho dne se z nich vyvinou zralé erythrocyty, které cirkulují v krvi asi 120 dní [82].

K malým ztrátám železa dochází v důsledku fyziologické exfoliace buněk z epitelálních povrchů, včetně kůže, urogenitálního traktu a gastrointestinálního traktu. Tyto ztráty jsou však velmi malé ( $\approx 1$  mg/den). U žen zvyšuje průměrnou denní ztrátu železa menstruace, na přibližně 2 mg denně. Kromě ztrát železa v důsledku menstruačního krvácení, různých jiných krvácení nebo těhotenství je železo vysoce konzervované a z těla se neztrácí. Neexistuje žádný aktivní eliminační mechanismus, pouze výše zmíněné pasivní cesty. Na druhé straně jsou ztráty železa během menstruace nejčastější příčinou nedostatku železa u žen. Příjem železa potravou je nutný k nahrazení železa vyloučeného pasivně stolicí, močí a také kůží [80,81].

Železo se v potravě vyskytuje ve dvou formách: hemové a nehemové. Primárními zdroji hemového železa jsou červené maso, drůbež a ryby, zatímco nehemové železo se získává z obilovin, luštěnin, ovoce a zeleniny. Hemové železo je vysoce biologicky dostupné a dietní faktory mají malý vliv na jeho absorpci, zatímco absorpce nehemového železa je mnohem nižší a je silně ovlivněna přítomností jiných složek potravy [81].



**Obr. 18. Hlavní tkáně zapojené do regulace metabolismu železa.** Převzato z Yiannikourides *et al.* (2019) [80].

Duodenální enterocyty jsou zodpovědné za absorpci železa z potravy. Po vstřebání železo cirkuluje v těle navázané na protein transferin a je vychytáváno různými tkáněmi pro využití. Retikuloendoteliální systém recykluje železo ze senescentních erytrocytů. Játra produkují hormon hepcidin, který řídí uvolňování železa z enterocytů a makrofágů do oběhu.

## 2.2.2 Měď

Měď je esenciální stopový kov, který se nachází ve všech živých organismech. Díky tomu, že se ionty Cu můžou vyskytovat stejně jako Fe jak v oxidovaném, tak v redukovaném stavu, má měď několik klíčových funkcí. V těle dospělého člověka je jí obsaženo asi 6 mg, přičemž nejvyšší koncentrace je v játrech [67,83]. V organismu slouží jako kofaktor řady důležitých enzymů, včetně cytochrom C oxidasy, tyrosinasy, *p*-hydroxyfenylpyruváthydrolasy, dopamin  $\beta$ -hydroxylasy, lisyloxidasy a Cu/Zn-dependentní superoxidodismutasy. Tyto enzymy se podílejí na řadě biologických procesů nezbytných pro růst a vývoj [67].

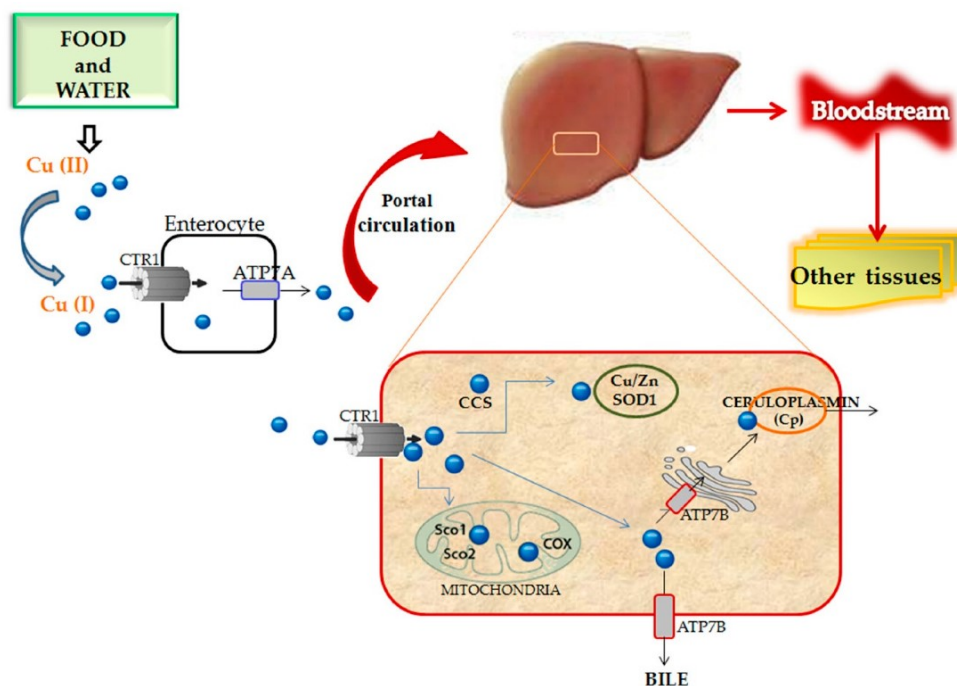
Denní příjem mědi je asi 0,8 mg. Lehce se liší v závislosti na stravovacích zvyklostech v různých zemích. Mezi potraviny bohaté na obsah Cu patří ústřice, játra, ořechy, luštěniny, celozrnné výrobky a sušené ovoce. Malé množství je také přijímáno v podobě pitné vody [67].

Cu z potravy vstupuje do těla na úrovni tenkého střeva, prochází přes enterocyty, vstupuje do portálního oběhu a do jater (Obr. 19). Dostává se do hepatocytů a dále je vylučována do krevního oběhu buď jako kofaktor ceruloplasminu nebo vázána na různé proteiny, jako je albumin nebo histidin. Tyto Cu-komplexy jsou distribuovány do ostatních orgánů a tkání podle potřeby. Přebytek Cu je vylučován z hepatocytů do žluči a ven z těla stolicí. Játra jsou tedy orgánem zodpovědným za distribuci Cu po celém těle a také za vylučování z těla ven [74].

ATP7A a ATP7B hrají klíčovou roli v distribuci mědi v lidském těle. Genetická inaktivace ATP7A vede k syndromu charakterizovanému závažným systémovým nedostatkem mědi, známému jako Menkesova choroba. Mutace ATP7B narušují naopak schopnost těla vylučovat měď do žluči, což způsobuje hromadění tohoto kovu v těle a onemocnění známé jako Wilsonova choroba. Poruchy v homeostáze mědi způsobené mutacemi ATP7A/B mají různé projevy, včetně neuropatie, anémie a kardiovaskulárních onemocnění [84].

V nadbytku může být měď cytotoxická. Stejně jako železo se může účastnit redoxních reakcí, vedoucích k produkci ROS, které jsou odpovědné za peroxidaci lipidů v membránách, přímou oxidaci proteinů a štěpení molekul DNA a RNA [83].

Nedostatek mědi není častý, může se projevit v ojedinělých případech, když je její příjem z potravy dlouhodobě nižší než doporučené denní množství. Zvýšený příjem je potřebný u těhotných a kojících žen. Stejně jako u osob se zhoršenou absorpcí u nich může být nutné měď doplňovat doplňky stravy [85].



**Obr. 19. Absorpce, distribuce a metabolismus mědi.** Převzato z Antonucci *et al.* (2017) [86].

Měď vstupuje do enterocytů přes CTR1 a vystupuje portálním oběhem prostřednictvím ATP7A. V játrech má Cu klíčovou roli v obraně proti ROS a v mitochondriálním dýchání. Měď vázána na ceruloplasmin se uvolňuje z jater do krevního řečiště a je pak transportována do dalších tkání a orgánů. ATP7B zajišťuje transport mědi přes membrány buněčných organel nebo umožňuje vylučování přebytečné mědi do žluči.

CTR1: selektivní transportér pro měď, CCS: Cu-chaperon pro superoxid dismutasu, COX: cytochrom C oxidasa, Sco1, Sco2: faktory cytochrom C oxidasy; Cu/Zn SOD: měď/zinek-dependentní superoxid-dismutasa, ATP7A/B: měď přenášející ATPasa A/B.

### 2.2.3 Kobalt

Kobalt (Co) patří mezi základní stopové prvky lidského těla. Vyskytovat se může jak v anorganické, tak organické formě. Prvně zmíněná forma – anorganická je nezbytná pro správné fyziologické fungování organismu. Organická forma kobaltu se nachází v zelených částech rostlin, rybách, obilovinách a vodě. Jedná se o přechodný kov. Nejčastěji se vyskytuje v oxidačním stupni  $\text{Co}^{2+}$  a  $\text{Co}^{3+}$ . Ostatní formy jsou vzácné. V lidském těle je tento esenciální stopový prvek přítomen v malém množství, cca 1-2 mg. Nachází se v srdci, játrech, ledvinách, slezině a v menším množství také ve slinivce břišní a mozku [87].

Jedinou známou biologickou molekulou obsahující kobalt je vitamin  $\text{B}_{12}$ , nazývaný také kyanokobalamin. Tento esenciální vitamin je nezbytný pro tvorbu červených krvinek a prevenci perniciózní anémie. Díky své schopnosti stimulovat tvorbu hemoglobinu a červených krvinek byl Co historicky používán k léčbě určitých typů anémie. Toto terapeutické použití bylo občas spojeno s vedlejšími účinky. Ty se projevily jako dysfunkce štítné žlázy u dětí a reverzibilní poškození zraku a sluchu u dospělých [88,89]. S kyselinou listovou se Co jako část vitaminu  $\text{B}_{12}$  podílí na tvorbě nukleových kyselin a některých aminokyselin. Samostatně je také důležitý pro syntézu a udržování myelinové pochvy v nervových buňkách. Účastní se jako koenzym na buněčné mitóze a tvorbě neurotransmiterů, které jsou nepostradatelné pro správnou funkci organismu [87-89].

Kvůli jeho rozšířenému výskytu v přírodě, se s Co a jeho sloučeninami setkáváme každý den. Do těla se dostává vdechováním okolního vzduchu, přes kůži a také příjmem potravin a pitné vody, které Co a jeho sloučeniny obsahují [88]. Používá se také ve zdravotnictví, v kloubních protézách a zubních implantátech, ze kterých se může uvolňovat do krevního oběhu. Bylo zdokumentováno i několik závažných otrav, kdy se z hlavy endoprotéz kyčle působením koroze a opotřebení uvolnilo velké množství Co. K otravám může dojít i v průmyslu např. kovovým prachem kobaltu při zpracování těžkých kovů [88,89].

Nedostatek kobaltu se projevuje poruchami v syntéze vitaminu  $\text{B}_{12}$ , které mohou vést k anémii, hypofunkci štítné žlázy a zvýšit riziko vývojových abnormalit u kojenců. Nadbytek tohoto kovu naopak může zvýšit činnost štítné žlázy a kostní dřeně, což může následně vést k nadprodukci erytrocytů, fibróze plic a astmatu [87].

### 3 CÍL PRÁCE

Cílem disertační práce bylo zjistit, jak interagují vybraní zástupci ze skupin dehydroflavonolignanů, flavonoidů a jejich metabolitů s mědí a železem pomocí *in vitro* a *ex vivo* metod a vývoj nové metody pro stanovení chelatace kobaltnatých iontů. Vzhledem k rozsáhlosti tématu bylo zvoleno několik dílčích cílů:

- a) Stanovení schopností vybraných fenolických látek chelatovat a redukovat ionty mědi a železa za pato/fyziologických podmínek. Případné určení stechiometrie a stabilitní konstanty vznikajícího komplexu.
- b) Otestování vlivu těchto látek na produkci hydroxylového radikálu v rámci kovy-indukované Fentonovy reakce.
- c) Ověření antioxidačního či pro-oxidačního působení vybraných látek na lýze červených krvinek navozené mědí.
- d) Vývoj nové metodiky pro testování chelatace kobaltnatých iontů.

## 4 RECENZOVANÉ ODBORNÉ PUBLIKACE S IMPAKT FAKTOREM, KTERÉ SE VZTAHUJÍ K TÉMATU DISERTAČNÍ PRÁCE

4.1 Dehydroflavonolignans from silymarin potentiate transition metal toxicity *in vitro* but are protective for isolated erythrocytes *ex vivo*

LOMOZOVÁ Z., TVRDÝ V., HRUBŠA M., CATAPANO M. C., MACÁKOVÁ K., BIEDERMANN D., KUČERA R., KŘEN V., MLADĚNKA P., VALENTOVÁ K., Dehydroflavonolignans from silymarin potentiate transition metal toxicity *in vitro* but are protective for isolated erythrocytes *ex vivo*. *Antioxidants*, 2021, 10(5), 679.

/IF<sub>2021</sub>=7.675/

/AIS<sub>2021</sub>=0.921/

/Q<sub>12021</sub>/IF v BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY/ Q<sub>12021</sub>/IF v CHEMISTRY, MEDICINAL/  
Q<sub>12021</sub>/IF v FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY/

Publikace je dostupná v plném znění v tištěné formě disertační práce anebo online

<https://www.mdpi.com/2076-3921/10/5/679>

## 4.2 Chelation of iron and copper by quercetin B-ring methyl metabolites, isorhamnetin and tamarixetin, and their effect on metal-based Fenton chemistry

LOMOZOVÁ Z., CATAPANO M. C., HRUBŠA M., KARLÍČKOVÁ J., MACÁKOVÁ K., KUČERA R., MLADĚNKA P., Chelation of iron and copper by quercetin B-ring methyl metabolites, isorhamnetin and tamarixetin, and their effect on metal-based Fenton chemistry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69 (21), 5926-5937.

/IF<sub>2021</sub>=5.895/

/AIS<sub>2021</sub>=0.791/

/Q1<sub>2021</sub>/IF v AGRICULTURE, MULTIDISCIPLINARY/ Q1<sub>2021</sub>/IF v CHEMISTRY, APPLIED/ Q1<sub>2021</sub>/IF v FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY/

Publikace je dostupná v plném znění v tištěné formě disertační práce anebo online

<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.jafc.1c01729>



### 4.3 The effect of flavonoids on the reduction of cupric ions, the copper-driven Fenton reaction and copper-triggered haemolysis

LOMOZOVÁ Z., HRUBŠA M., CONTE P. F., PAPASTEFANAKI E., MORAVCOVÁ M., CATAPANO M. C., PROIETTI SILVESTRI I., KARLÍČKOVÁ J., KUČERA R., MACÁKOVÁ K., MLADĚNKA P., The effect of flavonoids on the reduction of cupric ions, the copper-driven Fenton reaction and copper-triggered haemolysis. *Food Chemistry*, 2022, 394, 133461.

/IF<sub>2021</sub>=9.231/

/AIS<sub>2021</sub>=0.921/

/Q1<sub>2021</sub>/IF v CHEMISTRY, APPLIED/ Q1<sub>2021</sub>/IF v FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY/ Q1<sub>2021</sub>/IF v NUTRITION & DIETETICS/

Publikace je dostupná v plném znění v tištěné formě disertační práce anebo online

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814622014236>

#### 4.4 A complex methodological approach for the screening of efficient and safe cobalt chelators

MORAVCOVÁ M., HRUBŠA M., LOMOZOVÁ Z., CATAPANO M. C., ARGENTO R., JIRKOVSKÝ E., KUČERA R., MERCOLINI L., MLADĚNKA P., A complex methodological approach for the screening of efficient and safe cobalt chelators. *Medicinal Chemistry*, 2022, in press.

/IF<sub>2021</sub>=2.329/

/AIS<sub>2021</sub>=0.323/

Publikace je dostupná v plném znění v tištěné formě disertační práce anebo online

<https://www.eurekaselect.com/article/126825>

## 5 PODÍL KANDIDÁTA NA JEDNOTLIVÝCH PUBLIKACÍCH

### 4.1 Dehydroflavonolignans from silymarin potentiate transition metal toxicity *in vitro* but are protective for isolated erythrocytes *ex vivo*

- provedení experimentů na zjištění vlivu testovaných dehydroflavonolignanů na produkci hydroxylových radikálů z mědi a železem-spouštěné Fentonovy reakce
- zpracování a analýza dat
- příprava rukopisu

### 4.2 Chelation of iron and copper by quercetin B-ring methyl metabolites, isorhamnetin and tamarixetin, and their effect on metal-based Fenton chemistry

- provedení experimentů na zjištění schopnosti isorhamnetinu a tamarixetinu chelátovat a redukovat ionty mědi a železa, stanovení stechiometrie vznikajících komplexů, stanovení stabilitní konstanty vznikajících komplexů, zjištění vlivu testovaných látek na produkci hydroxylových radikálů z mědi a železem-katalyzované Fentonovy reakce
- zpracování a analýza dat
- příprava rukopisu

### 4.3 The effect of flavonoids on the reduction of cupric ions, the copper-driven Fenton reaction and copper-triggered haemolysis

- provedení části experimentů na zjištění měď-redukční aktivity testovaných flavonoidů, stanovení vlivu testovaných flavonoidů na produkci hydroxylových radikálů z mědi-spouštěné Fentonovy reakce, určení jejich vlivu na mědí-indukovanou lýzu červených krvinek
- zpracování a analýza dat
- příprava rukopisu

#### **4.4 A complex methodological approach for the screening of efficient and safe cobalt chelators**

- provedení experimentů na zjištění vlivu chelátorů kobaltu na produkci hydroxylových radikálů z kobaltem-spouštěné Fentonovy reakce
- zpracování a analýza dat produkce hydroxylových radikálů z kobaltem-katalyzované Fentonovy reakce
- příprava části rukopisu

## 6 KOMENTÁŘ K PUBLIKOVANÝM PRACEM

Tato práce je předkládána jako soubor čtyř publikací, které přímo souvisí s tématem disertační práce, a které byly publikovány v recenzovaných odborných časopisech s impaktním faktorem. Ve všech případech se jedná o původní experimentální práce.

Uvedené publikace navazují na předchozí studie provedené v rámci dlouhodobého výzkumu skupiny Kardiovaskulární a respirační farmakologie a toxikologie. Předložené publikace tvoří komplexní soubor prací a na různé úrovni se zabývají problematikou interakcí přírodních fenolických látek s přechodnými biogenními kovy železem a mědí. Předmětem zájmu byly látky ze skupiny flavonolignanů, flavonoidů a jejich metabolitů, které vznikají v lidském těle.

Vlastní experimentální práce přináší nové výsledky, které doplňují data z předešlých publikací [65,90-92]. Jedná se o studie kombinující *in vitro* a *ex vivo* metody, které zahrnují:

- screening chelatační a současně i redukční aktivity dvou dehydroflavonolignanů a dvou metabolitů kvercetinů vůči železu a mědi, s důrazem na vztah struktura-aktivita, včetně stanovení schopnosti látek ovlivnit tvorbu hydroxylových radikálů z mědi a železem-katalyzované Fentonovy reakce a následné porovnání účinku na lýze červených krvinek (publikace 4.1 a 4.2)
- charakteristiku vznikajících kovových komplexů s železem a mědí, stanovení stechiometrie a stabilitních konstant (publikace 4.2)
- testování schopnosti dvaceti čtyř strukturně příbuzných flavonoidů redukovat měďnaté ionty a ovlivnit tvorbu volných hydroxylových radikálů z mědi-spouštěné Fentonovy reakce, včetně působení na mědi-katalyzovanou hemolýzu (publikace 4.3)
- vývoj nové metodiky pro screening chelátorů kobaltu a zhodnocení jejich potencionální toxicity (publikace 4.4)

Skupina Kardiovaskulární a respirační farmakologie a toxikologie se již delší dobu věnuje výzkumu chelátorů železa a mědi. I přes v současné době úzké a specifické uplatnění v klinické praxi, jsou chelátory významnými léčivými s celou řadou potenciálního použití. Na intoxikace některými kovy (např. kobaltem) zatím nejsou lékovými agenturami (EMA, FDA) schválená žádná léčiva. I proto je stále žádoucí vyhledávat nové látky chelatuující přechodné kovy a dále objasňovat mechanismus jejich účinku. Fenolické látky se díky své struktuře a potenciálně nízké toxicitě jeví jako vhodné kandidáty. Na druhé straně existuje řada studií, které ukázaly, že tyto látky mohou mít za určitých podmínek pro-oxidační působení [93-97]. Proto je nutné vyloučit, že toto pro-oxidační působení je klinicky významné nebo vybrat látky, u kterých k tomuto účinku nedochází.

Podle výsledků předchozí *in vitro* studie se flavonolignany obsažené v silymarinu ukázaly pouze jako velmi slabé chelátory železa a mědi, které nebyly schopné tvořit stabilní kovové komplexy. Oproti tomu jedna jejich dehydroforma, konkrétně 2,3-dehydro-silybin (DHS), se ukázal jako silný a účinný chelátor železa i mědi [92]. Z toho důvodu byly DHS a 2,3-dehydro-silychristin (DHSCH) vybráni pro další otestování. I přesto, že DHS a DHSCH mají stejnou chelatační strukturu (3-hydroxy-4-ketoskupina) jejich chelatační aktivita byla rozdílná. Viditelné rozdíly se projevíly při chelataci mědi v nízkých pH, kde DHS byl účinnější než DHSCH. Nejpravděpodobnějším vysvětlením je možná interference chelatačního místa s hydroxymethylovou skupinou na D-kruhu DHSCH. V případě chelatace iontů železa byly oba dehydroflavonolignany srovnatelně účinné. Obě látky vykázaly velmi dobrou chelatační aktivitu jak železnatých, tak železitých iontů. Pouze při nižším pH (4,5) byla jejich účinnost slabší.

K základnímu screeningu chelatační aktivity měďnatých iontů byla použita metoda s indikátorem hematoxylinem. Jedná se o slabě kompetitivní metodu, ale v případě účinných chelátorů může sloužit i k odhadu stechiometrie vznikajícího komplexu. U některých látek může být, ale spojena s falešnou pozitivitou [98], a proto je nutné získané výsledky ověřit další metodikou. V našem případě byla následně k ověření chelatace i ke stanovení schopnosti chelátovat měď v obou oxidačních stavech použita spektrofotometrická kompetitivní metoda využívající bathokuproindisulfonát. To je rychlá, jednoduchá a přesná metodika, kterou lze použít za různých (pato)fyzilogických pH (4,5-7,5) a po lehké úpravě lze použít i ke stanovení redukce mědi [99]. Redukční aktivita látek je často považována za podklad antioxidačního působení, ale ve skutečnosti může vést

k opačnému účinku, tj. k pro-oxidaci, v důsledku podpory redoxního cyklu přechodných kovů [100]. Na stejném principu jako bathokuproinová metoda, funguje i ferrozinová metoda, která slouží ke stanovení chelatace a redukce iontů železa. Ferrozin je indikátor, který soutěží s testovanými látkami o vazbu kovových iontů a vzhledem k této konkurenci mezi indikátorem a testovanou látkou je možné porovnávat afinitu testovaných látek ke kovu a stabilitu jejich komplexů [47,101].

Měď-redukční účinnost DHS i DHSCH byla velmi vysoká a již při nízkých koncentračních poměrech dosahovala významných hodnot. Při srovnání DHS a DHSCH, byl druhý jmenovaný účinnější při pH 7,5 a 5,5, zatímco DHS byl účinnější při pH 4,5. Schopnost redukce železitých iontů byla u těchto látek pouze mírná. DHSCH se ukázal jako o něco účinnější redukční činidlo, který v poměru 1:1 redukovat zhruba 15 % železitých iontů, zatímco DHS pouze kolem 5 %.

Vzhledem k tomu, že je téměř nemožné teoreticky posoudit účinek sloučenin, které mají jak redukční, tak i chelatační vlastnosti na Fentonovu reakci [102], bylo působení DHSCH i DHS otestováno experimentálně na tvorbu OH• z mědi i železem-katalyzované Fentonovy reakce. K tomu byla použita velmi citlivá HPLC metoda s coulometrickou detekcí, která je schopna stanovit tvorbu OH• i za použití velmi nízkých koncentrací kovů a testovaných látek [103]. DHSCH vždy potencoval Fentonovu reakci, bez ohledu na oxidační stav mědi nebo hodnotu pH. Naproti tomu chování DHS bylo velmi specifické a často složité. Při železem-spouštěné Fentonově reakci byl účinek obou dehydroflavonolignanů vždy pro-oxidační nebo v nejlepším případě neutrální. U žádné z látek nebyla pozorována významná inhibice produkce OH•. Obecně DHSCH způsoboval větší pro-oxidaci než DHS.

V posledním kroku byl zkoumán účinek obou dehydroflavonolignanů na lýzu izolovaných potkaních červených krvinek vyvolanou mědí, aby se zjistilo, zda data z *in vitro* experimentům odpovídají působení *ex vivo*. Železo testováno nebylo, jelikož červené krvinky na něj obecně nejsou citlivé, a to ani ve vysokých koncentracích [104]. DHS i DHSCH byly schopny výrazně snížit mědí-spouštěnou hemolýzu. DHSCH dokonce dosáhl úplné inhibice hemolýzy při poměru 3:2 (DHSCH:Cu<sup>2+</sup>). Tyto výsledky tak neodpovídaly pozorování z *in vitro* experimentů, kde působení látek bylo převážně pro-oxidační. Pravděpodobným důvodem nesouladu mezi Fentonovou reakcí *in vitro* a hemolýzou spouštěnou mědí *ex vivo* je odlišný mechanismus. Zdá se, že u obou reakcí se uplatňuje redukovaná forma mědi a jsou tedy umožněny redukčními činidly, ale při Fentonově reakci

reagují měďné ionty přímo s peroxidem vodíku, zatímco v červených krvinkách se jeví, že měďné ionty redukují molekulární kyslík na superoxid, který je hlavním viníkem zodpovědným za poškození erytrocytů [105,106].

I vzhledem k těmto poněkud překvapivým výsledkům ukazujícím nesoulad mezi výsledky z Fentonovy reakce a lýzy červených krvinek, byly pro další testování vybrány flavonoidy, které jsou rozsáhlou skupinou fenolických látek běžně se vyskytujících v naší stravě a obecně mající pozitivní účinky na lidské zdraví. Jedním z diskutovaných mechanismů je právě interakce s přechodnými kovy [107]. Výhodou je také dobrá a cenově příznivá dostupnost řady těchto látek, což umožňuje provést rozsáhlejší analýzu struktura-účinek, než je tomu u relativně malé skupiny flavonolignanů izolovaných z ostropestřce. Chelatační a redukční aktivita flavonoidů vůči železu i mědi tak byla v minulých letech naší skupinou také hojně studována [65,90]. Jako esenciální se pro chelataci kovů ukázala dvojná vazba mezi polohami 2 a 3 základního skeletu, spolu s 3-hydroxy-4-ketoskupinou, 5,6-dihydroxy uspořádáním nebo 5,6,7-trihydroxy strukturou. Oproti tomu katecholový kruh B (3',4'-dihydroxyskupina) se ukázal jako pouze slabě aktivní. Nicméně flavonoidy mohou vedle antioxidační aktivity působit i pro-oxidačně. To bylo také prokázáno v jedné z předchozích studií, kde se u části testovaných flavonoidů potvrdila schopnost zvyšovat množství produkovaného  $\text{OH}\cdot$  z železem-katalyzované Fentonovy reakce a dobrá redukční aktivita železitých iontů v kyselém pH [91]. Látky, které podporují vznik oxidačního stresu, by potencionálně mohly mít využití v klinické praxi při léčbě nádorových onemocnění. Jedním z dílčích cílů naší další studie se tak stalo stanovení působení flavonoidů na produkci  $\text{OH}\cdot$  z mědi-katalyzované Fentonovy reakce, které předtím nebylo nikdy komplexně a systematicky zanalyzováno.

Jako první byla u dvaceti čtyř strukturně příbuzných flavonoidů změřena redukční aktivita vůči měďnatým iontům ve čtyřech (pato)fyzilogických pH. Naprostá většina flavonoidů tyto ionty redukovala a velká řada z nich dokonce dosáhla úplné (100%) redukce již po 5 minutách. Jejich chování však bylo rozdílné. Pouze 5-hydroxyflavon a chrysin byly schopni spontánní redukci mědi snížit. Na základě těchto výsledků se dá shrnout, že přítomnost alespoň 1 hydroxylové skupiny na kruhu B a 3-hydroxyskupiny byly nejdůležitějšími faktory pro redukční aktivitu. Naopak přítomnost 2,3-dvojně vazby a 4-ketoskupiny tuto aktivitu snížila. Souvislost mezi počtem hydroxylových skupin na kruhu A nebo B a redukčním potenciálem se zde ale neprokázala. V druhém kroku byl změřen vliv



flavonoidů na mědí-spouštěnou Fentonovu reakci. I zde jsme pozorovali rozdílné chování. Pouze 3-hydroxyflavon, 5-hydroxyflavon a troxerutin byly schopny tuto reakci zablokovat a měly antioxidační působení. Jako nejsilnější antioxidant se zde ukázal 5-hydroxyflavon. Naopak osm flavonoidů Fentonovu reakci potencovalo a mělo tak pro-oxidační působení. Nejsilnější produkce  $\text{OH}\cdot$  byla pozorována u baikaleinu. I v této studii bylo působení *in vitro* podmínkách porovnáno s výsledky z *ex vivo* experimentů sledujících lýzu potkaních červených krvinek. Na rozdíl od závěrů z Fentonovy reakce, naprostá většina testovaných flavonoidů chránila červené krvinky před toxicitou mědi. Jediným zástupcem, který zhoršil hemolýzu a působil tak pro-oxidačně byl nesubstituovaný flavon. Přidáním jedné hydroxylové skupiny do struktury flavonu ať už v poloze 3, 5 nebo 7 vždy nejen zablokovalo pro-oxidaci, ale také vedlo k výrazné ochraně červených krvinek. Nejsilnější antioxidační působení bylo pozorováno opět v případě 5-hydroxyflavonu.

Jedním z úskalí flavonoidních studií je to, že po perorálním podání do organismu jsou ještě před dosažením systémového oběhu velmi masivně metabolizovány, případně zpětně vyloučeny z enterocytů do lumen trávicího traktu. Biodostupnost většiny parentních flavonoidů je tedy velmi nízká [22]. U evropské populace jsou v potravě nejvíce zastoupenými flavonoidy flavanoly a po nich flavonoly [108]. Hlavním zástupcem flavonolů je kvercetin. Ten je běžně přítomen u mnoha léčivých rostlin, v ovoci a zelenině, ale také v doplňcích stravy, kde může být i ve velmi vysokých koncentracích [109]. Na jeho *in vitro* antioxidační a chelatační vlastnosti bylo publikováno velké množství prací [110,111]. Vzhledem k jeho zmíněné nízké biologické dostupnosti je však důležité znát také působení jeho metabolitů. Hlavními metabolity kvercetinu se zachovaným flavonoidním jádrem jsou jeho methylderiváty, isorhamnetin a tamarixetin. Významná část absorbovaného kvercetinu je v lidském těle přítomna právě ve formě těchto dvou metabolitů, přičemž ve větším množství se tvoří isorhamnetin [112,113]. Interakce isorhamnetinu a tamarixetinu s přechodnými kovy se staly předmětem naší další studie.

U obou látek byla stanovena chelatační aktivita železa a mědi pomocí již dříve popsaných kompetitivních metod. Jak isorhamnetin, tak tamarixetin vytvářely stabilní komplexy s železnatými i železitými ionty, přičemž jejich chelatační účinnost se snižovala se snižujícím se pH. V případě mědi, se kterou byly opět oba metabolity schopny vytvářet stabilní komplexy, byla chelatace mědných iontů nižší než měďnatých a také stabilita vznikajících komplexů byla nižší. Jelikož obě látky očividně chelatovaly ionty železa a mědi,

byla stanovena také stechiometrie jejich komplexů. Ta patří mezi základní charakteristiky komplexů a její znalost je důležitá nejen pro možné klinické uplatnění chelátorů. U látek přírodního původu je obecně stechiometrie často neznámá, je to dáno pravděpodobně tím, že tyto látky bývají oproti látkám chemického původu slabšími chelátory. U silných chelátorů jde stechiometrii za určitých podmínek odhadnout i pomocí kompetitivních metod. Její stanovení je však možné i pomocí měření absorpčních spekter testované látky a jejího vznikajícího komplexu s kovem v ultrafialové a viditelné oblasti. Jedná se o nekompetitivní testování. Tento postup je používán už poměrně dlouhou dobu. Jobova metoda vznikla jako první již v roce 1928 a používá se dodnes [114]. Jde o jednoduchou analytickou metodu, během níž je celková molární koncentrace dvou reaktantů konstantní, zatímco jejich molární koncentrační poměry se v sérii vzorků průběžně mění. Principem je, že nejvyšší množství komplexu bude vytvořeno za ideálních podmínek, a to nastane tehdy, když poměr koncentrací odpovídá stechiometrii komplexu. Vedle Jobovy metody jsme použily také komplementární metodu [115]. Ta byla v minulosti vyvinuta naší skupinou a na rozdíl od Jobovy metody spočívá v tom, že všechny vzorky mají stejnou koncentraci kovu a mění se pouze koncentrace testované látky. Následně se na základě stanovených molárních absorpčních koeficientů a naměřených spekter, pomocí šesti matematických výpočtů, určí nejpravděpodobnější stechiometrie komplexu. Tato metoda je vhodná především ke stanovení stechiometrie látek se středně silnou afinitou ke kovu, kde může Jobova metoda selhat nebo neposkytnout jednoznačné výsledky.

V případě isorhamnetinu se ukázalo, že nejpravděpodobnější stechiometrie jeho komplexu s železnatými i železitými ionty byla 2:1 (isorhamnetin:Fe<sup>2/3+</sup>). Ve vztahu k mědi byla stechiometrie méně jasná. Zdálo se, že nejstabilnější byl komplex 2:1, případně 3:2 (isorhamnetin:Cu<sup>2+</sup>). Pokud jde o měďné ionty, stechiometrii se nedalo stanovit s výjimkou pH 7,5, kde testování opět potvrdilo komplex 2:1. Výsledky týkající se tamarixetinu byly podobné, ale ne totožné s výsledky isorhamnetinu. V případě železnatých iontů byla stechiometrie závislá na podmínkách. Železité ionty byly chelátovány při pH 4,5 ve stechiometrickém poměru 2:1, při vyšším pH byla spíše pozorována stechiometrie 3:1. Pokud jde o měďnaté ionty, stechiometrie za nekompetitivních podmínek vycházela 3:2, případně 2:1 za kompetitivních podmínek při pH 6,8 a 7,5. Tyto výsledky nejsou vylučující a naopak naznačují, že komplexy 3:2 nejsou na rozdíl od těch 2:1 stabilní. Při nižším pH byla stechiometrie vysoce závislá na testovacích podmínkách. U měďných iontů je situace

analogická s isorhamnetinem, při pH 7,5 byla pozorována stechiometrie 2:1, zatímco při nižším pH je afinita příliš nízká, aby bylo možné stechiometrii stanovit. U vznikajících kovových komplexů byla určena také stabilitní konstanta. Ta následně umožňuje porovnání s ostatními studiemi. Nejvyšší hodnoty jsme získaly pro komplexy s železitými ionty, s tím, že mezi testovanými metabolity byly malé rozdíly.

I zde byla vedle schopnosti chelatace určena také redukční aktivita. Oba izomery dosáhly kompletní redukce měďnatých iontů kolem koncentračního poměru 1:1. Mezi oběma látkami byly jen malé rozdíly. V případě železitých iontů byla redukce pozorována pouze v pH 4,5 a 5,5. Isorhamnetin se ukázal jako mnohem více účinné redukční činidlo. Avšak při vyšších hodnotách pH nevykázal redukční aktivitu ani jeden z testovaných metabolitů.

Jelikož obě látky měly jak kov-chelatační, tak redukční schopnosti, jejich vliv na Fentonovu reakci byl určen experimentálně. Při železem-katalyzované Fentonově reakci bylo výsledné působení obou látek ve všech testovaných pH hodnotách pro-oxidační. Při reakcích s mědí, měl tamarixetin při pH 4,5 a 5,5 antioxidační účinek, zatímco u isorhamnetinu záležel výsledný účinek na koncentraci. V následném ověření účinku na *ex vivo* hemolýze, obě látky chránily červené krvinky před toxickým působením mědi a isorhamnetin byl o něco aktivnější.

Vzhledem k tomu, že chelátory jsou většinou neselektivní [116], bylo logickým vyústěním našeho testování vyzkoušet, zda by přírodní fenolické látky nebyly schopny chelatovat také kobalt. Tento kov je jedním z nejméně prozkoumaných biogenních kovů. V těle je ho obsaženo asi jen 1,1 mg a jedinou známou endogenní molekulou, která ho obsahuje je kobalamin, forma vitamínu B<sub>12</sub> [89]. I když jde o esenciální stopový prvek, jeho nadbytek je spojen s toxicitou. Intoxikace kobaltem je poměrně vzácným jevem, ale v poslední době bylo hlášeno několik případů závažných intoxikací kobaltem uvolněným z kovových protéz [88]. V takových případech pak není k dispozici žádný schválený chelátor a kazuistiky popisující léčbu těchto stavů nezjistily dostatečnou kobalt-chelatační účinnost u současně známých chelátorů kovů.

V době přípravy této práce nebyla k dispozici také žádná validovaná metoda na stanovení kobalt-chelatační aktivity. Z toho důvodu byla námi vyvinuta nová spektrofotometrická metoda, která umožňuje rychlou a přesnou detekci chelátorů kobaltu a následné porovnání jejich účinnosti. Metodika byla také ověřena pomocí čtyř známých

chelátorů kovů (EDTA, 8-hydroxychinolin, kloroxin a nitroxolin). Metoda byla validována pro široké spektrum pH (4,5-7,5), odrážející fyziologické i patofyziologické stavy v organismu. Umožňuje detekci ve velkém rozsahu vlnových délek, což je užitečné pro eliminaci potenciálních interferencí barevných sloučenin nebo jejich komplexů. Metoda je relativně vysoce citlivá, protože umožňuje detekci kobaltu v koncentracích od 25-200 nM v závislosti na pH. V současné době probíhá dokončování studie analyzující kobalt-chelatační účinky flavonoidů a výsledky budou v brzké době opublikovány.

Závěrem lze říci, že bylo prokázáno, že flavonoidy, včetně jejich methylmetabolitů a strukturálně blízkých flavonolignanů z ostropestřce, mají v případě přítomnosti funkčních skupin (zejména 3- nebo 5-hydroxyskupina a 4-ketoskupina, nebo katecholický kruh A) schopnost chelátovat biogenní kovy. Současně ale řada z nich také redukuje železité a měďnaté ionty. Tento jev je výraznější při přítomnosti katecholického kruhu B. Redukce zmíněných kovů může být spojena s potenciací Fentonovy reakce, a to také bylo u některých testovaných látek v této disertační práci prokázáno. Zajímavé ale je, že tento pro-oxidační účinek nebyl nalezen u lýzy červených krvinek navozené přidávkem mědi. Nabízí se tedy hypotéza, zda je testování Fentonovy reakce opravdu relevantní pro biologické prostředí nebo zda se jednotlivé lidské buňky chovají jinak. Jsou totiž také dostupné studie, které ukázaly, že měď zvyšuje toxicitu některých fenolických látek na bílé krvinky [117]. V dalších studiích je tedy nutné soustředit se na porovnání případných ochranných nebo toxických účinků i na jiné buňky než erytrocyty, které jsou přece jen díky absenci jádra poněkud specifické. Další klíčovou otázkou je způsob podání fenolických látek v případě, že by byly prokázány jejich protektivní účinky i na jiné buňky lidského těla při intoxikaci kovy. Evidentně je nelze podávat perorálně. Proto je zajímavé také otestovat jejich další metabolity, zejména ty tvořené lidskou mikroflórou. Ty mohou být zodpovědné za příznivé účinky perorálně podávaných flavonoidů a bude tedy zajímavé zjistit jejich účinky ve vztahu k biogenním kovům.

## 7 RECENZOVANÉ ODBORNÉ PUBLIKACE S IMPAKT FAKTOREM, KTERÉ SE NEVZTAHUJÍ K TÉMATU DISERTAČNÍ PRÁCE

### 7.1 Interactions of isoquinoline alkaloids with transition metals iron and copper

PARVIN M. S., CHLEBEK J., HOŠŤÁLKOVÁ A., CATAPANO M. C., LOMOZOVÁ Z., MACÁKOVÁ K., MLADĚNKA P., Interactions of isoquinoline alkaloids with transition metals iron and copper. *Molecules*, 2022, 27(19), 6429.

/IF<sub>2021</sub>=4.927/

/AIS<sub>2021</sub>=0.671/

### 7.2 Effects of heme site (FA1) ligands bilirubin, biliverdin, hemin, and methyl orange on the albumin binding of Site I marker warfarin: Complex allosteric interactions

LEMLI B., LOMOZOVÁ Z., HUBER T., LUKÁCS A., POÓR M., Effects of heme site (FA1) ligands bilirubin, biliverdin, hemin, and methyl orange on the albumin binding of Site I marker warfarin: Complex allosteric interactions. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23, 14007.

/IF<sub>2021</sub>=6.208/

/AIS<sub>2021</sub>=1.064/

## 8 SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obrázek 1.</b> Znázornění biosyntézy fenolických látek.....	4
<b>Obrázek 2.</b> Chemické struktury hlavních fenolických látek.....	6
<b>Obrázek 3.</b> Chemické struktury jednoduchých fenolů.....	7
<b>Obrázek 4.</b> Chemická struktura arbutinu.....	7
<b>Obrázek 5.</b> Chemická struktura nejběžnějších derivátů hydroxyskořicové kyseliny.....	8
<b>Obrázek 6.</b> Chemická struktura nejběžnějších derivátů hydroxybenzoové kyseliny.....	9
<b>Obrázek 7.</b> Chemická struktura kyseliny ellagové a ellagotaninů.....	9
<b>Obrázek 8.</b> Chemická struktura podofylotoxinu a jeho derivátů.....	11
<b>Obrázek 9.</b> Chemická struktura dehydroflavonolignanů.....	12
<b>Obrázek 10.</b> Chemická struktura resveratrolu.....	13
<b>Obrázek 11.</b> Základní chemické struktury kumarinů.....	14
<b>Obrázek 12.</b> Základní chemické struktury flavonoidů se zacykleným tříuhlíkatým spojovacím řetězcem.....	15
<b>Obrázek 13.</b> Základní chemické struktury flavonoidních sloučenin.....	18
<b>Obrázek 14.</b> Metabolismus nejběžnějšího flavonoidu kvercetinu.....	20
<b>Obrázek 15.</b> Vychytávání reaktivních forem kyslíku flavonoidy.....	22
<b>Obrázek 16.</b> Vazebná místa struktury flavonoidů pro kovové ionty.....	23
<b>Obrázek 17.</b> Periodická tabulka prvků nacházejících se v lidském těle.....	25
<b>Obrázek 18.</b> Hlavní tkáně zapojené do regulace metabolismu železa.....	29
<b>Obrázek 19.</b> Absorpce, distribuce a metabolismus mědi.....	31

## 9 SEZNAM ZKRATEK

DHS	2,3-dehydrosilybin
DHSCH	2,3-dehydrosilychristin
$O_2^{\bullet-}$	superoxidový radikál
$OH^{\bullet}$	hydroxylový radikál
RES	retikuloendoteliální systém
ROS	reaktivní formy kyslíku

## 10 PREZENTACE VÝSLEDKŮ NA KONFERENCÍCH

### 10.1 Přednášky

LOMOZOVÁ Z., KUČERA R., MLADĚNKA P.:

The effect of small phenolic metabolites of flavonoids (benzoic acids) on metal-triggered Fenton reaction and copper-induced red blood cell lysis

13. Postgraduální konference, 1.-2. 2. 2023, Hradec Králové

LOMOZOVÁ Z., MACÁKOVÁ K., KUČERA R., MLADĚNKA P.:

Analysis of the effect of flavonoids on copper-triggered Fenton reaction

12. Postgraduální konference, 1.-2. 2. 2022, Hradec Králové

LOMOZOVÁ Z., CATAPANO M. C., TVRDÝ V., MACÁKOVÁ K., KUČERA R., VALENTOVÁ K., MLADĚNKA P.:

Influence of dehydroflavonolignans from silymarin on metal-based Fenton reaction

11. Postgraduální konference, 27.-28. 1. 2021, Hradec Králové

LOMOZOVÁ Z., MACÁKOVÁ K., KARLÍČKOVÁ J., CATAPANO M. C., MLADĚNKA P.:

Analysis of copper-chelating activity of isorhamnetin and tamarixetin

10. Postgraduální konference, 22.-23. 1. 2020, Hradec Králové

LOMOZOVÁ Z., KARLÍČKOVÁ J., MLADĚNKA P.:

Interactions of tamarixetin and isorhamnetin with copper

Studentská vědecká konference, 16. 4. 2019, Hradec Králové

### 10.2 Plakátová sdělení

LOMOZOVÁ Z., HRUBŠA M., MORAVCOVÁ M., KUČERA R., MLADĚNKA P.:

Reduction of copper by flavonoids, their effects on the copper-triggered Fenton reaction and copper-induced red blood cell lysis

24<sup>th</sup> ISANH International conference on oxidative stress reduction, redox homeostasis and antioxidants, 22.-24. 6. 2022, Paříž, Francie



## 11 POUŽITÁ LITERATURA

1. Dai, J.; Mumper, R.J. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* **2010**, *15*, 7313-7352.
2. Ramawat, G.K.; Mérillon, J.M. *Natural products*; 2013.
3. Cheynier, V. Phenolic compounds: from plants to foods. *Phytochemistry Reviews* **2012**, *11*, 153-177.
4. Petroni, K.; Tonelli, C. Recent advances on the regulation of anthocyanin synthesis in reproductive organs. *Plant Science* **2011**, *181*, 219-229.
5. Bravo, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews* **1998**, *56*, 317-333.
6. Brossaud, F.; Cheynier, V.; Noble, A. Bitterness and astringency of grape and wine polyphenols. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **2001**, *7*, 33-39.
7. Velderrain-Rodriguez, G.R.; Palafox-Carlos, H.; Wall-Medrano, A.; Ayala-Zavala, J.F.; Chen, C.Y.; Robles-Sanchez, M.; Astiazaran-García, H.; Alvarez-Parrilla, E.; Gonzalez-Aguilar, G.A. Phenolic compounds: their journey after intake. *Food & Function* **2014**, *5*, 189-197.
8. Nagy, M.; Grancai, D.; Mucaji, P. *Farmakognozia, Biogeneza prirodných látok*; 2012.
9. Soto-Hernández, M.; García-Mateos, R.; Palma-Tenango, M. *Plant physiological aspects of phenolic compounds*; 2019.
10. Tsao, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* **2010**, *2*, 1231-1246.
11. Quideau, S.; Deffieux, D.; Douat-Casassus, C.; Pouysegu, L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50*, 586-621.
12. Ryan, D.; Antolovich, M.; Prenzler, P.; Robards, K.; Lavee, S. Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Scientia Horticulturae* **2002**, *92*, 147-176.
13. Kumar, N.; Goel, N. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports* **2019**, *24*, e00370.
14. Husain, N.; Gupta, S. A critical study on chemistry and distribution of phenolic compounds in plants, and their role in human health. *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology* **2015**, *1*, 57-60.
15. Badria, F.A. *Phenolic Compounds*; 2021.
16. Suresh, S.; Srivastava, V.C.; Mishra, I.M. Adsorption of catechol, resorcinol, hydroquinone, and their derivatives: a review. *International Journal of Energy and Environmental Engineering* **2012**, *3*, 32.
17. Migas, P.; Krauze-Baranowska, M. The significance of arbutin and its derivatives in therapy and cosmetics. *Phytochemistry Letters* **2015**, *13*, 35-40.
18. Al Jitan, S.; Alkhoori, S.A.; Yousef, L.F. *Studies in Natural Products Chemistry*; 2018.
19. Abotaleb, M.; Liskova, A.; Kubatka, P.; Busselberg, D. Therapeutic potential of plant phenolic acids in the treatment of cancer. *Biomolecules* **2020**, *10*, 221.
20. Vinayagam, R.; Jayachandran, M.; Xu, B. Antidiabetic effects of simple phenolic acids: A comprehensive review. *Phytotherapy Research* **2016**, *30*, 184-199.
21. Robbins, R.J. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, *51*, 2866-2887.
22. Del Rio, D.; Rodriguez-Mateos, A.; Spencer, J.P.; Tognolini, M.; Borges, G.; Crozier, A. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & Redox Signaling* **2013**, *18*, 1818-1892.

23. Landete, J.M. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. *Food Research International* **2011**, *44*, 1150-1160.
24. Rashmi, H.B.; Negi, P.S. Phenolic acids from vegetables: A review on processing stability and health benefits. *Food Research International* **2020**, *136*, 109298.
25. Cui, Q.; Du, R.; Liu, M.; Rong, L. Lignans and their derivatives from plants as antivirals. *Molecules* **2020**, *25*, 183.
26. Pilkington, L.I. Lignans: A chemometric analysis. *Molecules* **2018**, *23*, 1666.
27. Cornwell, T.; Cohick, W.; Raskin, I. Dietary phytoestrogens and health. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 995-1016.
28. Adlercreutz, H. Lignans and human health. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* **2007**, *44*, 483-525.
29. Canel, C.; Moraes, R.M.; Dayan, F.E.; Ferreira, D. Podophyllotoxin. *Phytochemistry* **2000**, *54*, 115-120.
30. Csupor, D.; Csorba, A.; Hohmann, J. Recent advances in the analysis of flavonolignans of *Silybum marianum*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2016**, *130*, 301-317.
31. Song, K.; Li, M.; Yang, Y.; Zhang, Z.; Zhu, Q.; Liu, J.; Wang, A. Natural flavonolignans as potential therapeutic agents against common diseases. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2022**, *74*, 337-350.
32. Tvrdy, V.; Pourova, J.; Jirkovsky, E.; Kren, V.; Valentova, K.; Mladenka, P. Systematic review of pharmacokinetics and potential pharmacokinetic interactions of flavonolignans from silymarin. *Medicinal Research Reviews* **2021**, *41*, 2195-2246.
33. Chong, J.; Poutaraud, A.; Huguene, P. Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Science* **2009**, *177*, 143-155.
34. Teka, T.; Zhang, L.; Ge, X.; Li, Y.; Han, L.; Yan, X. Stilbenes: Source plants, chemistry, biosynthesis, pharmacology, application and problems related to their clinical Application- A comprehensive review. *Phytochemistry* **2022**, *197*, 113128.
35. Reinisalo, M.; Karlund, A.; Koskela, A.; Kaarniranta, K.; Karjalainen, R.O. Polyphenol stilbenes: Molecular mechanisms of defence against oxidative stress and aging-related diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2015**, *2015*, 340520.
36. El Khawand, T.; Courtois, A.; Valls, J.; Richard, T.; Krisa, S. A review of dietary stilbenes: sources and bioavailability. *Phytochemistry Reviews* **2018**, *17*, 1007-1029.
37. Dudley, J.; Das, S.; Mukherjee, S.; Das, D.K. RETRACTED: Resveratrol, a unique phytoalexin present in red wine, delivers either survival signal or death signal to the ischemic myocardium depending on dose. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **2009**, *20*, 443-452.
38. Das, S.; Khan, N.; Mukherjee, S.; Bagchi, D.; Gurusamy, N.; Swartz, H.; Das, D.K. RETRACTED: Redox regulation of resveratrol-mediated switching of death signal into survival signal. *Free Radical Biology and Medicine* **2008**, *44*, 82-90.
39. Kalra, N.; Roy, P.; Prasad, S.; Shukla, Y. RETRACTED: Resveratrol induces apoptosis involving mitochondrial pathways in mouse skin tumorigenesis. *Life Sciences* **2008**, *82*, 348-358.
40. Sharifi-Rad, J.; Cruz-Martins, N.; Lopez-Jornet, P.; Lopez, E.P.; Harun, N.; Yeskaliyeva, B.; Beyatli, A.; Sytar, O.; Shaheen, S.; Sharopov, F.; et al. Natural coumarins: Exploring the pharmacological complexity and underlying molecular mechanisms. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2021**, *2021*, 6492346.
41. Barot, K.P.; Jain, S.V.; Kremer, L.; Singh, S.; Ghate, M.D. Recent advances and therapeutic journey of coumarins: current status and perspectives. *Medicinal Chemistry Research* **2015**, *24*, 2771-2798.

42. Macakova, K.; Rehakova, Z.; Mladenka, P.; Karlicková, J.; Filipisky, T.; Ríha, M.; Prasad, A.K.; Parmar, V.S.; Jahodar, L.; Pavek, P.; et al. In vitro platelet antiaggregatory properties of 4-methylcoumarins. *Biochimie* **2012**, *94*, 2681-2686.
43. Stringlis, I.A.; de Jonge, R.; Pieterse, C.M.J. The age of coumarins in plant-Microbe interactions. *Plant and Cell Physiology* **2019**, *60*, 1405-1419.
44. Catapano, M.C.; Karlickova, J.; Tvrdy, V.; Sharma, S.; Prasad, A.K.; Saso, L.; Chhillar, A.K.; Kunes, J.; Pour, M.; Parmar, V.S.; et al. Mono and dihydroxy coumarin derivatives: Copper chelation and reduction ability. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **2018**, *46*, 88-95.
45. Najmanova, I.; Dosedel, M.; Hrdina, R.; Anzenbacher, P.; Filipisky, T.; Ríha, M.; Mladenka, P. Cardiovascular effects of coumarins besides their antioxidant activity. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2015**, *15*, 830-849.
46. Filipisky, T.; Ríha, M.; Macakova, K.; Anzenbacherova, E.; Karlickova, J.; Mladenka, P. Antioxidant effects of coumarins include direct radical scavenging, metal chelation and inhibition of ROS-producing enzymes. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2015**, *15*, 415-431.
47. Mladenka, P.; Macakova, K.; Zatloukalova, L.; Rehakova, Z.; Singh, B.K.; Prasad, A.K.; Parmar, V.S.; Jahodar, L.; Hrdina, R.; Saso, L. In vitro interactions of coumarins with iron. *Biochimie* **2010**, *92*, 1108-1114.
48. Viskupicova, J.; Ondrejovic, M.; Sturdik, E. Bioavailability and metabolism of flavonoids. *Journal of Food and Nutrition Research* **2008**, *47*, 151-162.
49. Maleki, S.J.; Crespo, J.F.; Cabanillas, B. Anti-inflammatory effects of flavonoids. *Food Chemistry* **2019**, *299*, 125124.
50. Ullah, A.; Munir, S.; Badshah, S.L.; Khan, N.; Ghani, L.; Poulson, B.G.; Emwas, A.-H.; Jaremko, M. Important flavonoids and their role as a therapeutic agent. *Molecules* **2020**, *25*, 5243.
51. Dias, M.C.; Pinto, D.; Silva, A.M.S. Plant Flavonoids: Chemical characteristics and biological activity. *Molecules* **2021**, *26*, 5377.
52. Panche, A.N.; Diwan, A.D.; Chandra, S.R. Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science* **2016**, *5*, e47.
53. Labuda, J.; Bucková, M.; Heilerova, L.; Silhar, S.; Stepanek, I. Evaluation of the redox properties and anti/pro-oxidant effects of selected flavonoids by means of a DNA-based electrochemical biosensor. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2003**, *376*, 168-173.
54. Erlund, I.; Kosonen, T.; Alfthan, G.; Mäenpää, J.; Perttunen, K.; Kenraali, J.; Parantainen, J.; Aro, A. Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *European Journal of Clinical Pharmacology* **2000**, *56*, 545-553.
55. Chanet, A.; Milenkovic, D.; Manach, C.; Mazur, A.; Morand, C. Citrus flavanones: What is their role in cardiovascular protection? *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2012**, *60*, 8809-8822.
56. Heiss, C.; Keen, C.L.; Kelm, M. Flavanols and cardiovascular disease prevention. *European Heart Journal* **2010**, *31*, 2583-2592.
57. Krizova, L.; Dadakova, K.; Kasparovska, J.; Kasparovsky, T. Isoflavones. *Molecules* **2019**, *24*, 1076.
58. Spencer, J.P.; Abd-el-Mohsen, M.M.; Rice-Evans, C. Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2004**, *423*, 148-161.
59. Hollman, P.C.H. Absorption, bioavailability, and metabolism of flavonoids. *Pharmaceutical Biology* **2004**, *42*, 74-83.
60. Najmanova, I.; Pourova, J.; Voprsalova, M.; Pilarova, V.; Semecky, V.; Novakova, L.; Mladenka, P. Flavonoid metabolite 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid formed by human microflora decreases arterial blood pressure in rats. *Molecular Nutrition & Food Research* **2016**, *60*, 981-991.

61. Granato, D.; Shahidi, F.; Wrolstad, R.; Kilmartin, P.; Melton, L.D.; Hidalgo, F.J.; Miyashita, K.; Camp, J.v.; Alasalvar, C.; Ismail, A.B.; et al. Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban in vitro screening methods? *Food Chemistry* **2018**, *264*, 471-475.
62. Prochazkova, D.; Bousova, I.; Wilhelmova, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* **2011**, *82*, 513-523.
63. Treml, J.; Smejkal, K. Flavonoids as potent scavengers of hydroxyl radicals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2016**, *15*, 720-738.
64. Pietta, P.G. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products* **2000**, *63*, 1035-1042.
65. Riha, M.; Karlickova, J.; Filipovsky, T.; Macakova, K.; Rocha, L.; Bovicelli, P.; Silvestri, I.P.; Saso, L.; Jahodar, L.; Hrdina, R.; et al. In vitro evaluation of copper-chelating properties of flavonoids. *RSC Advances* **2014**, *4*, 32628-32638.
66. Cherrak, S.A.; Mokhtari-Soulimane, N.; Berroukeche, F.; Bensenane, B.; Cherbonnel, A.; Merzouk, H.; Elhabiri, M. In vitro antioxidant versus metal ion chelating properties of flavonoids: A structure-activity investigation. *PLoS One* **2016**, *11*, e0165575.
67. Gaetke, L.M.; Chow, C.K. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology* **2003**, *189*, 147-163.
68. Stadler, N.; Lindner, R.A.; Davies, M.J. Direct detection and quantification of transition metal ions in human atherosclerotic plaques: Evidence for the presence of elevated levels of iron and copper. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **2004**, *24*, 949-954.
69. Berenshtein, E.; Vaisman, B.; Goldberg-Langerman, C.; Kitrossky, N.; Konijn, A.M.; Chevion, M. Roles of ferritin and iron in ischemic preconditioning of the heart. *Molecular and Cellular Biochemistry* **2002**, *234*, 283-292.
70. Zoroddu, M.A.; Aaseth, J.; Crisponi, G.; Medici, S.; Peana, M.; Nurchi, V.M. The essential metals for humans: A brief overview. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2019**, *195*, 120-129.
71. Fraga, C.G. Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. *Molecular Aspects of Medicine* **2005**, *26*, 235-244.
72. Everett, J.; Lermyte, F.; Brooks, J.; Tjendana-Tjhin, V.; Plascencia-Villa, G.; Hands-Portman, I.; Donnelly, J.M.; Billimoria, K.; Perry, G.; Zhu, X.; et al. Biogenic metallic elements in the human brain? *Science Advances* **2021**, *7*, eabf6707.
73. Flora, S.J.; Mittal, M.; Mehta, A. Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian Journal of Medical Research* **2008**, *128*, 501-523.
74. Delangle, P.; Mintz, E. Chelation therapy in Wilson's disease: from d-penicillamine to the design of selective bioinspired intracellular Cu(i) chelators. *Dalton Transactions* **2012**, *41*, 6359-6370.
75. Hershko, C.; Link, G.; Konijn, A.M.; Cabantchik, Z.I. Objectives and mechanism of iron chelation therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2005**, *1054*, 124-135.
76. Ding, X.; Xie, H.; Kang, Y.J. The significance of copper chelators in clinical and experimental application. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **2011**, *22*, 301-310.
77. Poggiali, E.; Cassinerio, E.; Zanaboni, L.; Cappellini, M.D. An update on iron chelation therapy. *Blood Transfus* **2012**, *10*, 411-422.
78. Kwok, J.C.; Richardson, D.R. The cardioprotective effect of the iron chelator dexrazoxane (ICRF-187) on anthracycline-mediated cardiotoxicity. *Redox Report* **2000**, *5*, 317-324.
79. Gurzau, E.S.; Neagu, C.; Gurzau, A.E. Essential metals--case study on iron. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2003**, *56*, 190-200.
80. Yiannikourides, A.; Latunde-Dada, G.O. A short review of iron metabolism and pathophysiology of iron disorders. *Medicines* **2019**, *6*, 85.
81. Abbaspour, N.; Hurrell, R.; Kelishadi, R. Review on iron and its importance for human health. *Journal of Research in Medical Sciences* **2014**, *19*, 164-174.
82. Lieu, P.T.; Heiskala, M.; Peterson, P.A.; Yang, Y. The roles of iron in health and disease. *Molecular Aspects of Medicine* **2001**, *22*, 1-87.

83. Tapiero, H.; Townsend, D.M.; Tew, K.D. Trace elements in human physiology and pathology. Copper. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2003**, *57*, 386-398.
84. Chen, J.; Jiang, Y.; Shi, H.; Peng, Y.; Fan, X.; Li, C. The molecular mechanisms of copper metabolism and its roles in human diseases. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* **2020**, *472*, 1415-1429.
85. Prohaska, J.R. Impact of copper deficiency in humans. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2014**, *1314*, 1-5.
86. Antonucci, L.; Porcu, C.; Iannucci, G.; Balsano, C.; Barbaro, B. Non-alcoholic fatty liver disease and nutritional implications: Special focus on copper. *Nutrients* **2017**, *9*, 1137.
87. Czarnek, K.; Terpilowska, S.; Siwicki, A.K. Selected aspects of the action of cobalt ions in the human body. *Central European Journal of Immunology* **2015**, *40*, 236-242.
88. Leyssens, L.; Vinck, B.; Van Der Straeten, C.; Wuyts, F.; Maes, L. Cobalt toxicity in humans- A review of the potential sources and systemic health effects. *Toxicology* **2017**, *387*, 43-56.
89. Paustenbach, D.J.; Tvermoes, B.E.; Unice, K.M.; Finley, B.L.; Kerger, B.D. A review of the health hazards posed by cobalt. *Critical Reviews in Toxicology* **2013**, *43*, 316-362.
90. Mladenka, P.; Macakova, K.; Filipisky, T.; Zatloukalova, L.; Jahodar, L.; Bovicelli, P.; Silvestri, I.P.; Hrdina, R.; Saso, L. In vitro analysis of iron chelating activity of flavonoids. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2011**, *105*, 693-701.
91. Macakova, K.; Mladenka, P.; Filipisky, T.; Riha, M.; Jahodar, L.; Trejtnar, F.; Bovicelli, P.; Proietti Silvestri, I.; Hrdina, R.; Saso, L. Iron reduction potentiates hydroxyl radical formation only in flavonols. *Food Chemistry* **2012**, *135*, 2584-2592.
92. Tvrdy, V.; Catapano, M.C.; Rawlik, T.; Karlickova, J.; Biedermann, D.; Kren, V.; Mladenka, P.; Valentova, K. Interaction of isolated silymarin flavonolignans with iron and copper. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2018**, *189*, 115-123.
93. Simunkova, M.; Barbierikova, Z.; Jomova, K.; Hudecova, L.; Lauro, P.; Alwasel, S.H.; Alhazza, I.; Rhodes, C.J.; Valko, M. Antioxidant vs. prooxidant properties of the flavonoid, kaempferol, in the presence of Cu(II) ions: A ROS-scavenging activity, Fenton reaction and DNA damage study. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, *22*, 1619.
94. Azam, S.; Hadi, N.; Khan, N.U.; Hadi, S.M. Prooxidant property of green tea polyphenols epicatechin and epigallocatechin-3-gallate: implications for anticancer properties. *Toxicology in Vitro* **2004**, *18*, 555-561.
95. Murzakhmetova, M.; Moldakarimov, S.; Tancheva, L.; Abarova, S.; Serkedjieva, J. Antioxidant and prooxidant properties of a polyphenol-rich extract from *Geranium sanguineum* L. in vitro and in vivo. *Phytotherapy Research* **2008**, *22*, 746-751.
96. Jomova, K.; Hudecova, L.; Lauro, P.; Simunkova, M.; Alwasel, S.H.; Alhazza, I.M.; Valko, M. A switch between antioxidant and prooxidant properties of the phenolic compounds myricetin, morin, 3',4'-dihydroxyflavone, taxifolin and 4-hydroxy-coumarin in the presence of copper(II) ions: A spectroscopic, absorption titration and DNA damage study. *Molecules* **2019**, *24*, 4335.
97. Koziara, Z.; Baranowska, M.; Bartoszek, A.; Namieśnik, J. Comparison of redox properties of flavonoid aglycones and corresponding glycosides and their mixtures in the cellular model. *Proceedings* **2019**, *11*, 25.
98. Macakova, K.; Catapano, M.C.; Tvrdy, V.; Klimkova, K.; Karlickova, J.; Mladenka, P. Hematoxylin assay of cupric chelation can give false positive results. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **2019**, *52*, 29-36.
99. Riha, M.; Karlickova, J.; Filipisky, T.; Macakova, K.; Hrdina, R.; Mladenka, P. Novel method for rapid copper chelation assessment confirmed low affinity of D-penicillamine for copper in comparison with trientine and 8-hydroxyquinolines. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2013**, *123*, 80-87.
100. Murakami, K.; Yoshino, M. Prooxidant activity of aminophenol compounds: copper-dependent generation of reactive oxygen species. *BioMetals* **2022**, *35*, 329-334.

101. Stookey, L.L. Ferrozine---a new spectrophotometric reagent for iron. *Analytical Chemistry* **1970**, *42*, 779-781.
102. Nappi, A.J.; Vass, E. Hydroxyl radical formation via iron-mediated Fenton chemistry is inhibited by methylated catechols. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* **1998**, *1425*, 159-167.
103. Catapano, M.C.; Protti, M.; Fontana, T.; Mandrioli, R.; Mladenka, P.; Mercolini, L. An Original HPLC method with coulometric detection to monitor hydroxyl radical generation via Fenton chemistry. *Molecules* **2019**, *24*, 3066.
104. Mladenka, P.; Karlicková, J.; Hrubsa, M.; Veljovic, E.; Muratovic, S.; Carazo, A.; Shivling Mali, A.; Spirtovic-Halilovic, S.; Saso, L.; Pour, M.; et al. Interaction of 2,6,7-trihydroxy-xanthene-3-ones with iron and copper, and biological effect of the most active derivative on breast cancer cells and erythrocytes. *Applied Sciences* **2020**, *10*, 4846.
105. Aaseth, J.; Korkina, L.G.; Afanas'ev, I.B. Hemolytic activity of copper sulfate as influenced by epinephrine and chelating thiols. *Acta pharmacologica Sinica* **1998**, *19*, 203-206.
106. Aaseth, J.; Skaug, V.; Alexander, J. Haemolytic activity of copper as influenced by chelating agents, albumine and chromium. *Acta Pharmacologica et Toxicologica* **1984**, *54*, 304-310.
107. Mladenka, P.; Zatloukalova, L.; Filipisky, T.; Hrdina, R. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radical Biology and Medicine* **2010**, *49*, 963-975.
108. Vogiatzoglou, A.; Mulligan, A.A.; Lentjes, M.A.H.; Luben, R.N.; Spencer, J.P.E.; Schroeter, H.; Khaw, K.-T.; Kuhnle, G.G.C. Flavonoid intake in European adults (18 to 64 years). *PLOS ONE* **2015**, *10*, e0128132.
109. Vida, R.G.; Fittler, A.; Somogyi-Végh, A.; Poor, M. Dietary quercetin supplements: Assessment of online product informations and quantitation of quercetin in the products by high-performance liquid chromatography. *Phytotherapy Research* **2019**, *33*, 1912-1920.
110. Ferenczyova, K.; Kalocayova, B.; Bartekova, M. Potential implications of quercetin and its derivatives in cardioprotection. *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, *21*, 1585.
111. Xu, D.; Hu, M.-J.; Wang, Y.-Q.; Cui, Y.-L. Antioxidant activities of quercetin and its complexes for medicinal application. *Molecules* **2019**, *24*, 1123.
112. Wang, W.; Sun, C.; Mao, L.; Ma, P.; Liu, F.; Yang, J.; Gao, Y. The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. *Trends in Food Science & Technology* **2016**, *56*, 21-38.
113. Egert, S.; Wolffram, S.; Schulze, B.; Langguth, P.; Hubbermann, E.M.; Schwarz, K.; Adolphi, B.; Bosy-Westphal, A.; Rimbach, G.; Muller, M.J. Enriched cereal bars are more effective in increasing plasma quercetin compared with quercetin from powder-filled hard capsules. *British Journal of Nutrition* **2012**, *107*, 539-546.
114. Job, P. Recherches sur la formation des complexes minéraux en solution, et sur leur stabilite. *Annales de chimie et de physique* **1928**, *9*, 113-134.
115. Filipisky, T.; Riha, M.; Hrdina, R.; Vavrova, K.; Mladenka, P. Mathematical calculations of iron complex stoichiometry by direct UV-Vis spectrophotometry. *Bioorganic Chemistry* **2013**, *49*, 1-8.
116. Kim, J.-J.; Kim, Y.-S.; Kumar, V. Heavy metal toxicity: An update of chelating therapeutic strategies. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **2019**, *54*, 226-231.
117. Khan, H.Y.; Zubair, H.; Ullah, M.F.; Ahmad, A.; Hadi, S.M. Oral administration of copper to rats leads to increased lymphocyte cellular DNA degradation by dietary polyphenols: implications for a cancer preventive mechanism. *Biomaterials* **2011**, *24*, 1169-1178.