

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA FARMAKOGNOZIE A FARMACEUTICKÉ BOTANIKY

---



DIPLOMOVÁ PRÁCE

## **HLEDÁNÍ NOVÝCH PŘÍRODNÍCH INHIBITORŮ $\alpha$ -GLUKOSIDAS**

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Jana Karlíčková, Ph.D.

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

Hradec Králové, květen 2023

Michaela Kašpárková

CHARLES UNIVERSITY

FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRALOVE

DEPARTMENT OF PHARMACOGNOSY AND PHARMACEUTICAL BOTANY

---



DIPLOMA THESIS

## **SEARCH FOR NEW NATURAL $\alpha$ -GLUCOSIDASE INHIBITORS**

Supervisor: PharmDr. Jana Karlíčková, Ph.D.

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

Hradec Králové, May, 2023

Michaela Kašpárková

## **PROHLÁŠENÍ**

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

## **PODĚKOVÁNÍ**

Tímto bych ráda poděkovala paní PharmDr. Janě Karličkové, Ph.D za její cenné rady, milý přístup a vstřícnou pomoc při vypracovávání této diplomové práce. Také bych ráda poděkovala panu Mgr. Marcelu Hrubšovi za sestavení postupu pro průběh experimentu a panu prof. PharmDr. Přemyslu Mladěnkovi, Ph.D za jeho pomoc a odborné rady při zpracovávání výsledků. Nemalý dík patří také mé rodině, která mě po celou dobu studia podporovala.

## ABSTRAKT

**Univerzita Karlova**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra katedra farmakognozie a farmaceutické botaniky**

**Studentka:** Michaela Kašpárková

**Školitel:** PharmDr. Jana Karlíčková, Ph.D.

**Název diplomové práce:** Hledání nových přírodních inhibitorů  $\alpha$ -glukosidas

$\alpha$ -glukosidasa je jedním z hlavních enzymů, které štěpí sacharidy v trávicím traktu. Její fyziologickou funkcí je zejména štěpení  $\alpha$ -(1,4) vazeb oligosacharidů a umožnění vstřebávání D-glukosy do krevního řečiště. V důsledku toho dochází ke zvyšování postprandiálních hodnot glykemie v krvi, což není žádoucí u pacientů s diabetickým onemocněním či u osob s vysokým rizikem pro jeho vznik.

Flavonoidy jsou přírodní polyfenolické látky vyskytující se v mnoha přirozených složkách naší potravy. Tyto látky jsou známé svými pozitivními účinky na lidské zdraví, mezi něž patří také schopnost inhibovat enzym  $\alpha$ -glukosidasu. Cílem této práce bylo proto stanovení inhibiční aktivity flavonoidů vůči enzymu  $\alpha$ -glukosidase a následné posouzení vztahu struktura-účinek.

Za použití dvaceti dvou vybraných flavonoidů z pěti různých strukturálních skupin byla s využitím spektrofotometrického měření stanovena *in vitro* inhibice  $\alpha$ -glukosidasy pocházející z kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Výsledky byly porovnány podle křivek znázorňujících 95% konfidenční intervaly vztahu mezi inhibicí enzymu a koncentrací testované látky.

Výsledky měření ukázaly, že šest látek (kempferol, morin, kvercetin, luteolin, 7,8-dihydroxyflavon a hesperetin) inhibovalo kvasinkovou  $\alpha$ -glukosidasu účinněji než registrované léčivo akarbose, které bylo v této práci zvoleno jako standardní látka. Tyto flavonoidy měly několik společných strukturálních podobností zahrnujících hydroxyskupiny na uhlících číslo 3, 5, 7 a 4', ketoskupinu na uhlíku číslo 4 a dvojnou vazbu mezi 2. a 3. uhlíkem.

Závěrem lze shrnout, že některé přírodní flavonoidy by mohly být zajímavou alternativou akarbosy, ale je třeba jejich účinky ještě potvrdit na savčí  $\alpha$ -glukosidase.

## ABSTRACT

**Charles University**

**Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany**

**Student:** Michaela Kašpárková

**Supervisor:** PharmDr. Jana Karlíčková, Ph.D.

**Title of diploma thesis:** Search for new natural  $\alpha$ -glucosidase inhibitors

$\alpha$ -glucosidase is one of the main enzymes that break down carbohydrates in the digestive tract. Its physiological function is mainly the cleavage of  $\alpha$ -(1,4) bonds of oligosaccharides and enabling the absorption of D-glucose into the bloodstream. As a result, there is an increase in postprandial blood glucose values, which is not desirable in patients with diabetes or in people with a high risk of developing it.

Flavonoids are natural polyphenolic substances found in many natural components of our food. These substances are known for their positive effects on human health, which also include the ability to inhibit the  $\alpha$ -glucosidase enzyme. Therefore, the aim of this work was to determine the inhibitory activity of flavonoids against the  $\alpha$ -glucosidase enzyme and the subsequent assessment of the structure-activity relationship.

Using twenty-two selected flavonoids belonging to five different structural groups, the inhibitory activity on the yeast  $\alpha$ -glucosidase from *Saccharomyces cerevisiae* was determined by spectrophotometric measurements *in vitro*. The results were compared according to the curves showing the 95% confidence intervals of the relationship between enzyme inhibition and the concentration of the test substance.

The measurement results showed that six substances (kaempferol, morin, quercetin, 7,8-dihydroxyflavone, luteolin and hesperetin) inhibited yeast  $\alpha$ -glucosidase more effectively than the registered drug acarbose, which was chosen as the standard substance in this work. These flavonoids shared several structural similarities, including hydroxy groups on carbons 3, 5, 7, and 4', a keto group on carbon 4, and a double bond between carbons 2 and 3.

In conclusion, some natural flavonoids could be an interesting alternative to acarbose, but their effects on mammalian  $\alpha$ -glucosidase still need to be confirmed.

## OBSAH

1. ÚVOD .....	9
2. CÍL PRÁCE.....	10
3. SEZNAM ZKRATEK.....	11
4. TEORETICKÁ ČÁST .....	12
4.1 DIABETES MELLITUS 2. TYPU .....	12
4.1.1 Etiopatogeneze a patofyziologie onemocnění.....	12
4.1.2 Kritéria pro stanovení diagnózy onemocnění diabetes mellitus 2. typu.....	12
4.1.3 Využívaná léčiva .....	12
4.1.3.1 Akarbosa.....	13
4.2 GLUKOSIDASY .....	14
4.2.1 $\alpha$ -glukosidasa.....	15
4.2.1.1 Lidská $\alpha$ -glukosidasa.....	15
4.2.1.1.1 Intestinální $\alpha$ -glukosidasa.....	15
4.2.2 Role intestinálních glukosidas v procesu trávení škrobu .....	17
4.3 FLAVONOIDY.....	17
4.3.1 FLAVANONY .....	19
4.3.1.1 Naringenin .....	19
4.3.1.2 Naringin .....	20
4.3.1.3 Hesperetin .....	21
4.3.1.4 Hesperidin .....	22
4.3.2 FLAVANOLY.....	23
4.3.2.1 Katechin.....	24
4.3.2.2 Epikatechin .....	24
4.3.3 FLAVANONOLY .....	25
4.3.3.1 Taxifolin .....	26
4.3.4 FLAVONY.....	27
4.3.4.1 Flavon .....	27
4.3.4.2 5-hydroxyflavon.....	28
4.3.4.3 7-hydroxyflavon.....	29
4.3.4.4 7,8-dihydroxyflavon.....	30
4.3.4.5 Baikalein .....	30
4.3.4.6 Baikalin .....	31
4.3.4.7 Luteolin.....	32

4.3.4.8 Diosmin.....	33
4.3.4.9 Chrysin.....	34
4.3.5 FLAVONOLY .....	35
4.3.5.1 3-hydroxyflavon.....	36
4.3.5.2 Kvercetin.....	36
4.3.5.3 Kempferol.....	37
4.3.5.4 Morin.....	38
4.3.5.5 Rutin .....	39
4.3.5.6 Troxerutin.....	40
5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	42
5.1 MATERIÁL .....	42
5.2 PŘÍSTROJE.....	42
5.3 CHEMIKÁLIE.....	42
5.4 TESTOVANÉ LÁTKY.....	43
5.5 STATISTICKÁ ANALÝZA A VYUŽÍVANÉ PROGRAMY.....	44
5.6 METODIKA MĚŘENÍ INHIBICE $\alpha$ -GLUKOSIDASY.....	44
5.6.1 Příprava zásobních a pracovních roztoků.....	44
5.6.2 Metodický postup stanovení inhibice $\alpha$ -glukosidasy .....	45
6. VÝSLEDKY.....	47
6.1 Matematické stanovení výsledků.....	47
6.2 Statistické zhodnocení výsledků.....	48
6.3 Grafické znázornění výsledků s využitím 95% konfidenčních intervalů .....	48
6.4 Grafické porovnání inhibiční aktivity vybraných flavonoidů a akarbosy při použití 95% konfidenčních intervalů.....	53
7. DISKUZE .....	57
8. ZÁVĚR .....	62
9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	63
10. ZDROJE OBRÁZKŮ A TABULEK.....	70



## 1. ÚVOD

$\alpha$ -glukosidasy jakožto enzymy štěpící složené sacharidy na glukosové jednotky hrají významnou roli v systému zvyšování glykemie v lidském těle. Díky jejich inhibici můžeme zamezit rychlému vzestupu postprandiální glykemie, což je výhodné u pacientů trpících diabetickým onemocněním. <sup>(1,2)</sup> Diabetes mellitus je celosvětově jedním z nejvýznamnějších problémů veřejného zdraví. Podle údajů Mezinárodní diabetologické federace z roku 2021 trpí diabetem přibližně 537 milionů dospělých a v roce 2045 pravděpodobně tento počet dosáhne 783 milionů. <sup>(3)</sup>

Léčiva ze skupiny inhibitorů  $\alpha$ -glukosidas existují prozatím pouze tři: miglitol, voglibosa a akarbose. V České republice je prozatím obchodovaná pouze akarbose. Kvůli jejímu účinku nezávislému na inzulínu je teoreticky využitelná u obou typů diabetu, ovšem registrovaná je pouze pro léčbu diabetu typu 2. Toto léčivo není však pro své velmi časté gastrointestinální potíže a pro nízkou úhradu pojišťovnou příliš oblíbeno. <sup>(1,2)</sup>

V posledních letech roste počet vědeckých prací zabývajících se výzkumem nových přírodních inhibitorů  $\alpha$ -glukosidas. <sup>(4)</sup> Vzhledem k tomu, že metformin, využívaný u diabetu druhého typu jako léčivo první volby, byl odvozen od přírodní látky galeginu, je hledání nových léčiv proti diabetu v rostlinném světě naprosto opodstatněné. <sup>(5)</sup> Kvůli svému vyššímu terapeutickému potenciálu a přirozenému výskytu v naší stravě jsou častým předmětem zájmu v hledání nových léčivých látek flavonoidy. Ty se běžně vyskytují v naší stravě a vykazují velmi nízkou toxicitu, což umožňuje jejich bezpečné pravidelné užívání. <sup>(6)</sup> Právě flavonoidy v několika studiích hodnotících vliv přírodních látek na účinnost  $\alpha$ -glukosidas ukazovaly nejpříznivější výsledky. <sup>(7,8)</sup>

## 2. CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo objasnit inhibiční potenciál 22 vybraných flavonoidů vůči enzymu  $\alpha$ -glukosidase a posoudit na základě získaných hodnot, zda jsou tyto výsledky terapeuticky relevantní.

### 3. SEZNAM ZKRATEK

**ACH** – Alzheimerova choroba

**ASD** – porucha autistického spektra

**BD** – biologická dostupnost, biodostupnost

**C** – uhlíkový atom

**ČDS** – Česká diabetologická společnost

**DM** – diabetes mellitus

**DM1** – diabetes mellitus 1. typu (insulin-dependentní)

**DM2** – diabetes mellitus 2. typu (non-insulin-dependentní)

**EC** – číslo enzymové komise; Enzyme Commission number

**GAA** – kyselá  $\alpha$ -glukosidasa

**MGAM** – maltasa-glukoamylasa

**p.a.** – pro analýzu

**PAD** – perorální antidiabetika

**PCH** – Parkinsonova choroba

**PLGA** – kyselina polymléčná-glykolová

**PEG** – polyethylenglykol

**SI** – sacharasa-isomaltasa

## 4. TEORETICKÁ ČÁST

### 4.1 DIABETES MELLITUS 2. TYPU

Diabetes mellitus 2. typu (DM2) je nejčastější formou diabetu. V České republice jím v současnosti trpí více než 220 000 pacientů a počet každým rokem roste. Spolu s diabetem 1. typu (DM1), gestačním diabetem a ostatními specifickými druhy diabetu (např. MODY – maturity-onset diabetes of the young či LADA – latent autoimmune diabetes of adults) tvoří skupinu heterogenních metabolických onemocnění, která se vyskytují napříč všemi věkovými skupinami. Je pro ně charakteristická zvýšená hladina glykémie v krvi doprovázená inzulinovou rezistencí či poruchou inzulinové tvorby nebo sekrece, popřípadě kombinací zmíněných. <sup>(1,9,10,11,12)</sup>

#### 4.1.1 Etiopatogeneze a patofyziologie onemocnění

Diabetes mellitus 2. typu vzniká za přítomnosti faktorů jak genetických, tak vnějšího prostředí. Pro DM2 je typická kombinace inzulinové rezistence a snížení tvorby inzulinu. Na podkladě špatného životního stylu a genetických predispozic dochází nejprve k poškození inzulinových receptorů a následně k inzulinové rezistenci. V důsledku toho vzniká v krvi hyperglykémie. Pankreatické buňky reagují na tento stav zvýšenou sekrecí inzulinu. Po určité době ale tento systém udržování normoglykémie vede k částečnému narušení inzulinové sekrece a může skončit až absolutním nedostatkem inzulinu. <sup>(9)</sup>

#### 4.1.2 Kritéria pro stanovení diagnózy onemocnění diabetes mellitus 2. typu

Dle České diabetologické společnosti (ČSD) trpí DM2 pacient, který má hodnotu náhodně naměřené glykémie  $>11,1$  mmol/l a hodnotu glykémie měřenou nalačno ze žilní plasmy  $\geq 7,0$  mmol/l. Při nepřítomnosti klinické manifestace hyperglykémie je dle ČDS třeba měření glykémie ze žilní krve provést alespoň 2x a to po minimálně osmihodinovém lačnění. Dalším způsobem zjištění poruchy glykémie je orální glukózový toleranční test – oGTT. Hladina glykémie v odebrané žilní krvi nemá ve 120. minutě po vypití glukózového roztoku přesáhnout 11,1 mmol/l. <sup>(13,14)</sup>

#### 4.1.3 Využívaná léčiva

Pro zahájení léčby již manifestovaného DM2 jsou vedle změny životního stylu využívána perorální antidiabetika (PAD). Pokud není kontraindikován, je léčivem první volby metformin. V případě, že pacient nedostatečně odpovídá na monoterapii, zvolí se vhodná

kombinace jednotlivých lékových skupin antidiabetik včetně inzulínu. Jednotlivé lékové skupiny jsou vyobrazeny v následující tabulce (Tabulka č.1). <sup>(1,14)</sup>

LÉKOVÁ SKUPINA	ZÁSTUPCI*
Biguanidy	metformin
Deriváty sulfonylurey	glimepirid, gliklazid, gliquidon, glipizid
Analoga GLP-1	exenatid, liraglutid, lixisenatid, semaglutid, dulaglutid
Inhibitory DPP-4 (gliptiny)	sitagliptin, vildagliptin, saxagliptin, linagliptin, alogliptin
Inhibitory SGLT-2 (glifloziny)	empagliflozin, dapagliflozin, ertugliflozin, kanagliflozin
Thiazolidindiony	pioglitazon
Inhibitory $\alpha$ -glukosidasy	akarbosa
Glinidy	repaglinid
Inzulíny	rychle působící: inzulín lidský, aspart, glulisin, lispro; střednědobě působící: lidský-NPH; dlouze působící: glargin, detemir, degludek

\*zástupci lékové skupiny dostupní k datu 21.11.2022

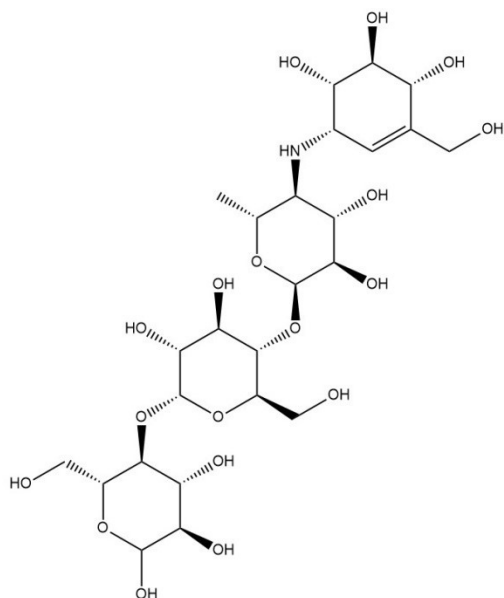
Tabulka č. 1: Shrnutí dostupných léčiv užívaných v terapii onemocnění diabetes mellitus

#### 4.1.3.1 Akarbosa

Jako standard pro tuto práci byla zvolena akarbosa, která se získává fermentací bakterií *Actinoplanes* sp. kmene SE50. Její strukturu tvoří dvě části: akarviosinová struktura a maltosa navázaná na jejím redukčním konci (Obr. č.1). V tlustém střevě je akarbosa působením střevní mikroflóry na tyto dvě strukturální jednotky rozštěpena a ve větší míře vyloučena z těla. <sup>(15)</sup>

Akarbosa je u nás jediné léčivo z PAD, které lze využít při léčbě pacienta jak s DM2, tak s DM1, avšak využívána je pouze u typu non-insulin-dependentního. Může se užit v monoterapii i v kombinaci, a to s metforminem, deriváty sulfonylurey nebo inzulinem. Mechanismem antidiabetického účinku této pseudotetrasacharidové molekuly je reverzibilní inhibice střevních  $\alpha$ -glukosidas. Důsledkem je snížení hladiny postprandiální glykemie inhibicí rozštěpení disacharidů, oligosacharidů a polysacharidů na glukosové jednotky. Snížení postprandiální koncentrace glukosy v těle rovněž přispívá ke zvýšení citlivosti na inzulín, snížení množství glykosylovaného hemoglobinu (HbA1, HbA1c) a snížení hodnot glykemie nalačno. <sup>(2,15)</sup>

Jelikož po užití akarbosy ale zůstávají ve střevě ve větším množství nestrávené sacharidové řetězce, dochází k rozvoji gastrointestinálních nežádoucích účinků. Mezi nejčastější z nich patří flatulence, borborygmus, abdominální distenze, průjem a gastrointestinální bolesti. <sup>(2,15)</sup>



Obrázek č.1: Chemická struktura akarbosy ((2R,3R,4R,5R)-4-[(2R,3R,4R,5S,6R)-5-[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4-dihydroxy-6-methyl-5-[[[(1S,4R,5S,6S)-4,5,6-trihydroxy-3-(hydroxymethyl)cyclohex-2-en-1-yl]amino]oxan-2-yl]oxy-3,4-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy-2,3,5,6-tetrahydroxyhexanal)

## 4.2 GLUKOSIDASY

Glukosidasy jsou enzymy, které můžeme najít u eukaryot i prokaryot. Hydrolyticky štěpí vazby v oligosacharidech, polysacharidech a glykokonjugátech (glykolipidy, glykoproteiny) obsahujících glukosu. Řadí se do enzymové třídy hydrolasy, podtřídy glykosylasy a skupiny glykosidasy. EC (Enzyme Commission) klasifikace rozlišuje 217 různých glykosidas, mezi kterými lze najít 37 různých glukosidas. Přítomnost glukosidas v našem těle je zásadní pro několik biochemických procesů: degradaci složitých polysacharidů a oligosacharidů z potravy na monosacharidové jednotky schopné se absorbovat; katabolismus lyzozomálních glykokonjugátů a zpracování glykoproteinů; biosyntézu oligosacharidových jednotek v glykoproteinech nebo glykolipidech. <sup>(16,17)</sup>

Pro lidské trávení složených sacharidů jsou významné dvě  $\alpha$ -amylasy a 4 druhy glukosidas – glukan 1,4- $\alpha$ -glukosidasa (EC 3.2.1.3; glukoamylasa), oligo-1,6-glukosidasa (EC 3.2.1.10; isomaltasa),  $\alpha$ -1,4-glukosidasa (EC 3.2.1.20;  $\alpha$ -glukosidasa; maltasa) a sacharosa alfa-glukosidasa (EC 3.2.1.48; sacharasa). <sup>(6,16,17)</sup> Maltasa a glukoamylasa tvoří dohromady jednu enzymovou strukturu označující se jako maltasa-glukoamylasa (MGAM), která je

zakotvena v epiteliálních buňkách kartáčového lemu tenkého střeva. Tento enzymový komplex má vysokou  $\alpha$ -(1,4) hydrolytickou aktivitu vůči maltooligosacharidům a produktem jeho aktivity je D-glukosa. Sacharasa a isomaltasa jsou syntetizovány ve střevních buňkách jako jediný glykoproteinový řetězec sacharasa-isomaltasa (SI), který se následně štěpí na jednotlivé enzymové domény. Tyto domény se poté na povrchu epiteliálních buněk střevní stěny znovu, tentokrát nekovalentně, spojí v jeden komplex SI. Obě katalytické domény disponují  $\alpha$ -(1,4) hydrolytickou aktivitou. Sacharasová část enzymu dokáže navíc hydrolyticky štěpit  $\alpha$ -(1,2) vázané oligosacharidy, isomaltasová část zase oligosacharidy spojené vazbou  $\alpha$ -(1,6). Produktem štěpení SI jsou glukosa a fruktosa. <sup>(6,18)</sup>

#### 4.2.1 $\alpha$ -glukosidasa

Z předchozího textu je patrné, že  $\alpha$ -glukosidasa (EC 3.2.1.20;  $\alpha$ -1,4-glukosidasa; maltasa) je enzym, který zprostředkovává hydrolytické štěpení terminálních, neredukujících  $\alpha$ -(1,4) vázaných zbytků  $\alpha$ -D-glukosy s uvolněním D-glukosy. Částečně je účinný také vůči  $\alpha$ -(1,6) vazbám. <sup>(23)</sup>  $\alpha$ -glukosidasa je přítomná v rozličných organismech. Z hlediska podobnosti v aminokyselinových sekvencích a substrátové specifitě můžeme  $\alpha$ -glukosidasu rozdělit na bakteriální, kvasinkovou (*Saccharomyces cerevisiae*) a hmyzí  $\alpha$ -glukosidasu I a plísňovou, rostlinnou a savčí  $\alpha$ -glukosidasu II. <sup>(19)</sup>

##### 4.2.1.1 Lidská $\alpha$ -glukosidasa

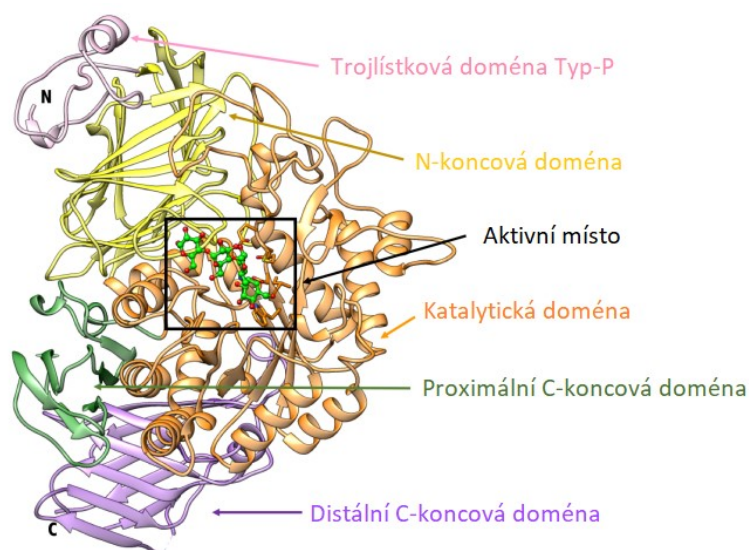
Lidská  $\alpha$ -glukosidasa (EC 3.2.1.20) má dva podtypy. Prvním typem je kyselá lysozomální  $\alpha$ -glukosidasa (GAA). GAA fyziologicky štěpí  $\alpha$ -(1,4) i  $\alpha$ -(1,6) vazby glykogenu v lysozomech. Při mutaci genu kódujícího GAA dochází k narušení funkce tohoto enzymu, což vede k akumulaci lysozomálního glykogenu a k poškození buněk všech tkání (nejvíce kosterního a srdečního svalstva). Tato mutace se projevuje jako autozomálně recesivně dědičné onemocnění glykogenóza II. typu, známá také jako Pompeho nemoc. <sup>(20)</sup> Druhým typem je intestinální  $\alpha$ -glukosidasa.

##### 4.2.1.1.1 Intestinální $\alpha$ -glukosidasa

Jak je zmíněno v předchozím textu, intestinální  $\alpha$ -glukosidasa se v našem těle vyskytuje jako enzymový komplex s glukoamylasou (MGAM). Je to membránově vázaný enzym, který se vyskytuje po celé délce tenkého střeva. Štěpí hlavně  $\alpha$ -(1,4) vazby, ale má i velmi malou  $\alpha$ -(1,6) aktivitu. <sup>(22,23)</sup>

Samotná  $\alpha$ -glukosidasová jednotka s velikostí  $\sim 100$  kDa je složena z pěti strukturálních domén a skládá se z 868 aminokyselinových zbytků (Obr. č. 2). První doménu tvoří trojlístková doména Typ-P (zbytky 1 – 51).<sup>(18,22)</sup> Ta se může chovat jako sekundární doména vázající substrát.<sup>(21)</sup> Druhou doménou je N-koncová  $\beta$ -sendvičová doména (zbytky 52 – 269). Třetí doménou je katalytická doména, složená z  $(\beta/\alpha)_8$  barelové domény a dvou vložených smyček (zbytky 270 – 651). Následují proximální (zbytky 652 – 730) a distální (zbytky 731 – 868) C-koncové domény, obě s  $\beta$ -sendvičovým strukturálním uspořádáním.<sup>(18,22)</sup>

Aktivní místo  $\alpha$ -glukosidasy má formu mělké kapsy s pouze dvěma podmísty pro cukr. Kvůli tomu tento enzym přednostně váže a štěpí kratší substráty. To  $\alpha$ -glukosidasu z hlediska afinity k substrátu odlišuje od glukoamylasy, která má díky 21 aminokyselinovým zbytkům v aktivním místě navíc vazebná místa pro cukr čtyři, díky čemuž může vázat větší substráty. Enzymová kapsa tvořící aktivní místo  $\alpha$ -glukosidasy je tvořená převážně C-koncovými zbytky  $\beta$ -řetězce katalytické  $(\beta/\alpha)_8$  barelové domény. K architektuře vazebného místa substrátu také přispívají dvě dříve zmíněné vložené smyčky a smyčka pocházející z N-koncové  $\beta$ -sendvičové domény (Obr. č. 2).<sup>(18,22)</sup> Při vazbě akarbosy do vazebného místa se interakce s enzymem účastní primárně akarbosinová strukturální část, která vyplňuje obě podmísta pro cukr. Vazbu zajišťují zejména četné vodíkové vazby. Mezi enzymem a glykosylovou částí akarbosy téměř žádné interakce nevznikají.<sup>(22)</sup>



Obrázek č.2: Struktura intestinálního enzymu  $\alpha$ -glukosidasy (3.2.1.20) s navázanou akarbosou v aktivním místě



#### 4.2.2 Role intestinálních glukosidas v procesu trávení škrobu

Škroby uchovávají energii ve všech vyšších rostlinách a představují proto v lidské stravě hlavní zdroj energie. Škrobové molekuly se skládají z amylosy a amylopektinu. Molekulu amylosy tvoří zejména lineárně spojené molekuly glukosy, které mezi sebou tvoří vazby  $\alpha$ -(1,4). Molekula amylopektinu je oproti tomu více rozvětvená díky obsahu  $\alpha$ -(1,6) vazeb. <sup>(23,24)</sup>

Proces trávení škrobu zahajují slinná a pankreatická  $\alpha$ -amylasa. Ta štěpí intramolekulární  $\alpha$ -(1,4) vazby škrobu na krátké lineární či rozvětvené dextrinové řetězce. Ty jsou následně zpracovávány střevními glukosidasami. <sup>(22,24)</sup>

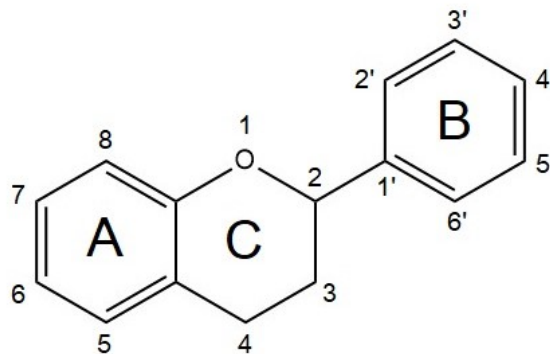
Role glukosidas spočívá v zajištění poslední fáze přeměny škrobu na jednotky glukosy. Přestože komplex glukosidas SI je ve střevě více hojný než komplex MGAM a zajišťuje také štěpení rozvětvených dextrinů svou  $\alpha$ -(1,6) aktivitou, jeho hydrolytická aktivita je pomalá. MGAM oproti tomu disponuje vysokou hydrolytickou aktivitou. Enzymy SI jsou tedy spíše důležité pro udržení stabilní glykémie, zvláště po konzumaci vysoce glykemických potravin. MGAM se svou vysokou aktivitou zajišťují tělu rychlý přísun glukosy, což má vliv na náhlý nárůst postprandiální glykémie. Právě inhibicí  $\alpha$ -glukosidas (maltasy) či glukán 1,4- $\alpha$ -glukosidas (glukoamylasy) můžeme nejlépe předcházet nežádoucímu vysokému nárůstu hodnot postprandiální glykémie v těle. <sup>(22,23,24)</sup>

#### 4.3 FLAVONOIDY

Flavonoidy jsou běžné sekundární metabolity mnoha rostlin. Tyto látky přírodního původu se tedy běžně vyskytují v naší stravě. Ve velkém množství je můžeme nalézt například v ovoci a zelenině (především ve slupkách), ve skořápkových plodech, obilovinách, ale také v nápojích přírodního původu jako jsou ovocné šťávy, pivo, víno a čaje. <sup>(25,26)</sup>

Flavonoidy jsou polyfenolické látky vyskytující se buď ve volné formě anebo vázané na cukry. Jejich základ tvoří struktura složená z patnácti uhlíků, jednoho kyslíku a čtrnácti vodíků. Tyto prvky tvoří dvě benzenová jádra (kruh A aruh B) propojená pomocí pyranového kruhu (kruh C) (Obr. č. 3). Základní struktura je nadále modifikována navázáním hydroxyskupin, ketoskupin či vytvořením dvojných vazeb mezi uhlíky číslo C2 a C3. <sup>(27)</sup>

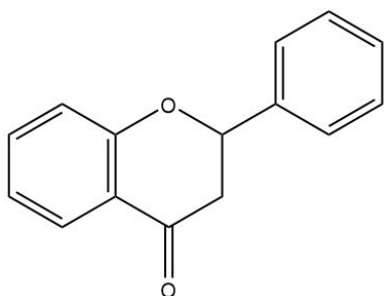
Aglykony flavonoidů se v rostlinách syntetizují šikimátovou a acetátovou biosyntetickou cestou. Produkt šikimátové cesty cinnamoylkoenzym A kondenzuje s produkty acetátové cesty (3 molekuly malonylkoenzymu A) za vzniku chalkonu, který posléze přechází na základní flavonoidní strukturu. K té může být v terminální fázi syntézy připojena glykosidová struktura. <sup>(25,28)</sup>



Obrázek č.3: Základní struktura flavonoidů (2-fenyl-3,4-dihydro-2H-chromen)

Dle počtu a poloh substituentů na C kruhu flavonoidů rozlišujeme několik hlavních skupin: flavony, flavanony, flavan-3-oly, flavan-3,4-dioly, flavonoly, flavanonoly (dihydroflavonoly), chalkony a aurony. Zejména deriváty flavanu a flavonu se využívají nejčastěji, a to pro jejich vyšší terapeutickou hodnotu. Flavonoidy mají široké spektrum terapeutického účinku, přičemž nejvíce jsou používány jako venofarmaka a venoprotektiva. Krom toho ovšem disponují mnoha dalšími terapeuticky využívanými účinky např. protizánětlivými, antibakteriálními, antivirovými či účinky umožňujícími inhibovat některé enzymy. Bylo také zjištěno, že flavonoidy jsou díky své antioxidační aktivitě vysoce účinné v prevenci peroxidace lipidů. Ta je zodpovědná za narušení především biologických membrán a lipoproteinů. Díky své polaritě jsou flavonoidy v těle zakotveny v polární části fosfolipidové dvojvrstvy membrány a chrání ji tak před volnými radikály přicházejícími z vodného prostředí. Flavonoidy chrání i LDL lipoproteinové částice, jejichž lipoperoxidace vede k rozvoji předčasné aterosklerózy. <sup>(25,26,29)</sup>

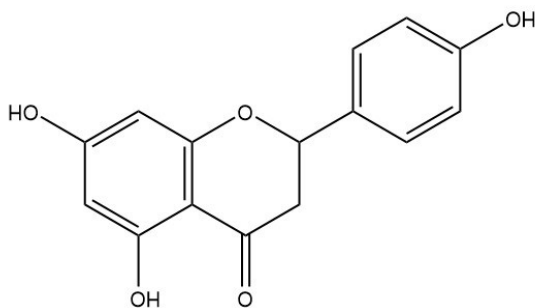
### 4.3.1 FLAVANONY



Obrázek č. 4: Obecná chemická struktura skupiny flavanonů (2-fenyl-2,3-dihydrochromen-4-on)

Flavanony jsou skupinou flavonoidů, která se liší od základního chemického vzorce ketoskupinou v poloze 4 na kruhu C (Obr. č. 4). Vyskytují se jak ve formě volného aglykonu, tak ve formě glykosylované. Flavanony bývají často glykosylovány v poloze C7 a glykosidovou část tvoří nejčastěji disacharidy (například neohesperidosa nebo rutinosa). Flavanony se obecně vyskytují ve všech citrusových plodech, kde způsobují jejich nahořklou chuť. Můžeme je ale také najít v některých aromatických bylinách (máta, dobromysl, rozmarýn). Tyto látky jsou spojovány s významnými radikál-vychytávajícími účinky, díky nimž působí antioxidačně, protizánětlivě a pozitivně na lipidový profil. <sup>(26,28,30)</sup>

#### 4.3.1.1 Naringenin



Obrázek č. 5: Chemická struktura naringeninu (5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyfenyl)-2,3-dihydrochromen-4-on)

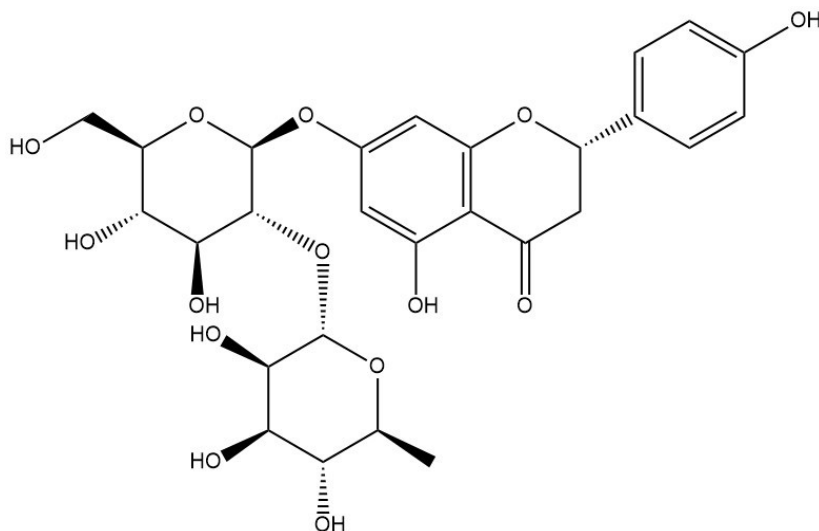
Naringenin je aglykon tvořený flavanonovou strukturou obohacenou o tři hydroxylové skupiny v polohách C5, C7 a C4' (Obr. č. 5). V největším množství se naringenin v naší potravě nachází v citrusech, rajčatech a fících. Má mnoho pozitivních účinků na organismus včetně účinku protizánětlivého, antioxidačního, antimikrobiálního či kardioprotektivního. Studie *in vivo* ukazují, že největší benefity z kardioprotektivního účinku naringeninu získávají pacienti, u kterých se již projevilo kardiovaskulární onemocnění.

V dvojité zaskřížené studii prokázal schopnost snižovat diastolický tlak.

U naringenu byly v některých studiích prokázány hepatoprotektivní, antifibrinogenní a preventivní z hlediska ztučnění jater. V játrech navíc zesiluje intracelulární signální reakce na nízké dávky inzulínu senzibilizací hepatocytů na inzulín. <sup>(31,32)</sup>

*In vivo* studií s naringeninem bohužel proběhlo jen několik, a to kvůli jeho špatné stabilitě a nízké biodostupnosti (BD) po perorálním podání (jen asi 15 %). Ve většině *in vivo* studií byl proto používán jeho glykosid naringin, který je díky přítomnosti cukerné části v molekule rozpustnější ve vodě a má tedy lepší biodostupnost. <sup>(31,32)</sup>

#### 4.3.1.2 Naringin



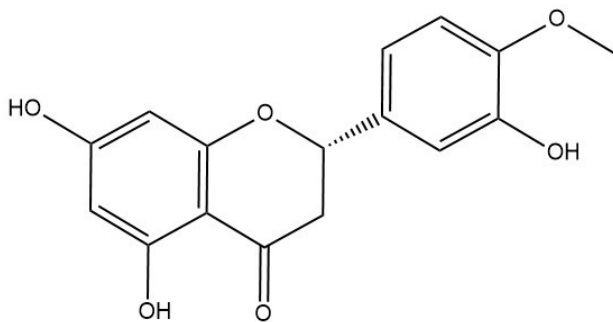
Obrázek č. 6: Chemická struktura naringinu ((2S)-7-[(2S,3R,4S,5S,6R)-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)-3-[(2S,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxyoxan-2-yl]oxy-5-hydroxy-2-(4-hydroxyfenyl)-2,3-dihydrochromen-4-on)

V naší stravě se vyskytuje více než samotný aglykon naringenin, což může být vysvětleno jeho vyšší polaritou, a tudíž vyšší koncentrací v rostlinných šťávách. <sup>(30)</sup> Vyšší polarita je způsobena navázaným disacharidem zvaným neohesperidosa. Ta je připojena na hydroxylovou skupinu v pozici C7 (Obr. č. 6). <sup>(33)</sup>

Stejně jako aglykon naringenin je i naringin nejvíce obsažen v citrusových plodech, hlavně v pomerančích, grapefruitech a v bergamotu. Naringin po podání *per os* a jaterní metabolizaci zůstává jak částečně nezměněn, tak částečně metabolizován na naringenin nebo převeden na glukuronidy, sulfáty či apiferol (2-(4-hydroxyfenyl)chroman-4,5,7-triol). <sup>(33)</sup>

Jak naringin, tak naringenin, prokázaly účinnost ve snižování hyperlipidemie. Mechanismy účinku se ale různily dle průběhu jednotlivých studií (zejména kvůli rozdílům ve zdravotním stavu pacientů).<sup>(33)</sup> Kromě hypolipidemického účinku ale naringin disponuje také protizánětlivými a protirakovinnými účinky, působí pozitivně na regeneraci kostní hmoty, metabolický syndrom, oxidativní stres, genetická poškození či nemoci centrální nervové soustavy.<sup>(34)</sup>

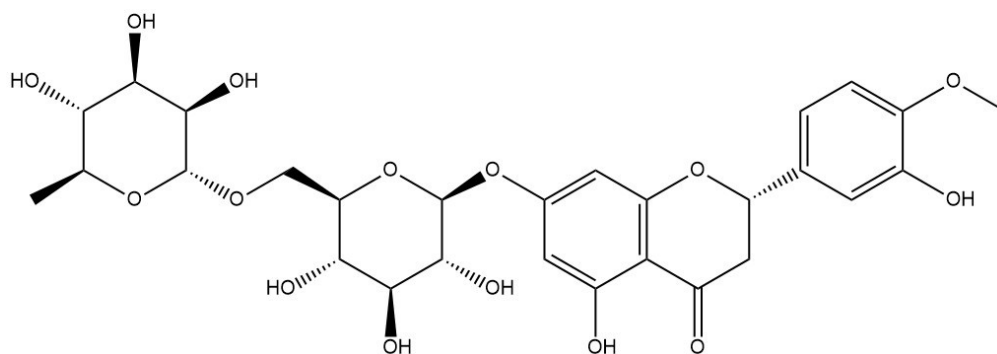
#### 4.3.1.3 Hesperetin



Obrázek č. 7: Chemická struktura hesperetinu ((2S)-5,7-dihydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyfenyl)-2,3-dihydrochromen-4-on)

Hesperetin se liší svou strukturou od základní struktury flavanonové třemi hydroxylovými skupinami v polohách C5, C7 a C3'. V poloze C4' má navíc navázanou methoxylovou skupinu (Obr. č. 7). Hojně se nachází v citrusových plodech a některých bylinách (máta, šalvěj, třezalka).<sup>(35)</sup> Tato přírodní látka je antioxidantem, který působí dvěma způsoby: přímým pohlčováním radikálů a posilováním buněčné antioxidační obrany.<sup>(36)</sup> Díky své antioxidační schopnosti má také spolu s jeho glykosidem hesperidinem účinky chemopreventivní a chemoterapeutické. Hesperetin má oproti hesperidinu navíc ještě schopnost indukovat apoptózu (glykosidová část hesperidinu apoptotický účinek významně snižuje).<sup>(37)</sup>

#### 4.3.1.4 Hesperidin



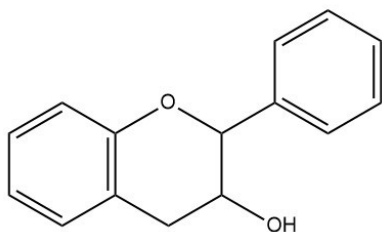
Obrázek č. 8: Chemická struktura hesperidinu ((2S)-5-hydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyfenyl)-7-[[[2S,3R,4S,5S,6R]-3,4,5-trihydroxy-6-[[[(2R,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxy-2,3-dihydrochromen-4-on)

Hesperidin je rutinoidem aglykonu hesperetinu. Cukernou složku má navázanou v poloze C7 (Obr. č. 8). Jeho přírodní výskyt je víceméně totožný s hesperetinem. V terapii se využívá spolu s vitamínem C pro svůj pozitivní vliv na pevnost a propustnost kapilár. Používaný je také u hypertenze. <sup>(25)</sup> Kromě toho ovšem vykazuje také neuroprotektivní, antikarcinogenní, antialergické a protizánětlivé účinky. <sup>(36)</sup>

Stejně jako u hesperetinu je i u hesperidinu významná jeho antioxidační aktivita. Ve studiích posuzujících vliv antioxidantů na ochranu buněčné membrány červených krvinek proti H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-indukovanému oxidativnímu poškození měl hesperidin antioxidační aktivitu srovnatelnou s kyselinou askorbovou a troloxem (hydrofilní derivát vitamínu E). Řada studií prokázala, že hesperidin neutralizuje reaktivní formy kyslíku (ROS), včetně superoxidových aniontů, hydroxylových radikálů, peroxynitritu a radikálů oxidu dusnatého. Spolu s hesperetinem hrají roli v ochraně DNA, proteinů a tkání před poškozením vnitřního (onkogenu) i vnějšího (záření, zánět) původu. <sup>(36)</sup>

Naneštěstí mají hesperetin i hesperidin velmi nízkou biodostupnost kvůli své špatné rozpustnosti ve vodě. Dalším důvodem nízké BD je fakt, že jsou substrátem P-glykoproteinu, což jejich biologickou dostupnost ještě snižuje. Některé studie ale prokázaly, že hesperetin a hesperidin jsou nejen substrátem P-glykoproteinu, ale mají schopnost jeho účinek také inhibovat. <sup>(35)</sup>

### 4.3.2 FLAVANOLY



Obrázek č. 9: Obecná chemická struktura flavanolů (2-fenyl-3,4-dihydro-2H-chromen-3-ol)

Flavanoly, také zvané dihydroflavonoly či katechiny, jsou skupinou flavonoidů hojně se vyskytující v kakau, čaji, banánech, jablkách, borůvkách, hruškách a broskvích.

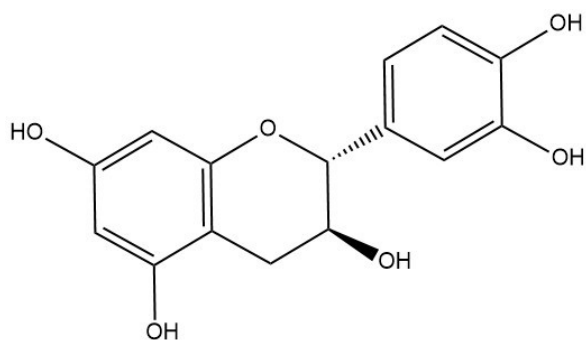
Tato skupina flavonoidů je charakteristická hydroxylovou skupinou v poloze C3 a absencí dvojné vazby mezi druhým a třetím uhlíkem (Obr. č. 9).<sup>(28,38)</sup> Na rozdíl od většiny flavonoidů se flavanoly v naší stravě nevyskytují v glykosylované formě. Mohou ovšem tvořit oligomery až polymery. Tyto molekuly poté označujeme jako proanthocyanidiny (alternativně procyanidiny).<sup>(38)</sup>

Flavanoly jsou látky stabilní. Absorbují se v tenkém střevě a poté podléhají v játrech metabolizaci druhé fáze (za vzniku zejména sulfátů, glukuronidů a methylovaných derivátů). Oligomery a polymery se z trávicího traktu absorbují jen málo. Drtivá většina je metabolizována střevními bakteriemi v tlustém střevě.<sup>(38)</sup>

Jak ukazuje nespočet studií, flavanoly disponují mnoha pozitivními účinky na lidské zdraví, zejména pro své antioxidační, protizánětlivé, antikarcinogenní, imunomodulační, antialergické a antivirové účinky. Kromě toho několik studií naznačuje, že mají flavanoly i účinky preventující nebo oddalující vznik několika chronických onemocnění.<sup>(38)</sup>

Epidemiologické a klinické studie navíc naznačují schopnost flavanolů snížit riziko cévních onemocnění. Popsán byl u této skupiny flavonoidů rovněž vliv na snížení krevního tlaku.<sup>(39)</sup>

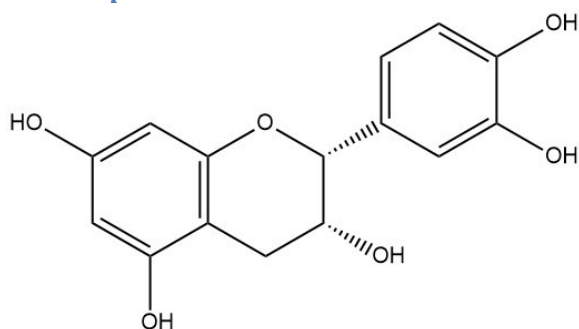
#### 4.3.2.1 Katechin



Obrázek č. 10: Chemická struktura katechinu ((2R,3S)-2-(3,4-dihydroxyfenyl)-3,4-dihydro-2H-chromen-3,5,7-triol)

V naší stravě se tento flavanol vyskytuje především v ovoci, v kakaových výrobcích, v čaji a ve víně. Od základní flavanolové struktury se katechin liší hydroxylovými skupinami v polohách C5, C7, C3' a C4' (Obr. č. 10). Označení katechin je odvozeno od dřeviny *Acacia catechu*, odkud byla poprvé tato látka izolována. <sup>(40)</sup> Je známý pro své antioxidační, protizánětlivé, protimikrobní, antifungální a cytotoxické účinky. Ukazuje se být účinný také jako hepatoprotektivum a na zvířecích modelech vykazuje pozitivní účinek při léčbě diabetické autonomní neuropatie. V novějších studiích byl objeven jeho antialergický účinek. Výsledky ukázaly, že katechin dokáže snížit u myší příznaky alergické rýmy a účinně bojuje proti vzniklému zánětu nosní sliznice. <sup>(41)</sup>

#### 4.3.2.2 Epikatechin



Obrázek č. 11: Chemická struktura epikatechinu ((2R,3R)-2-(3,4-dihydroxyfenyl)-3,4-dihydro-2H-chromen-3,5,7-triol)

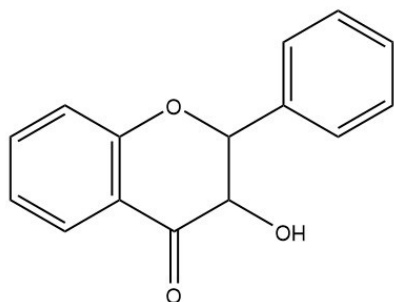
Epikatechin je enantiomerem katechinu. Jeho molekula má substituenty v polohách C2 a C3 v *cis* formě, na rozdíl od katechinu, který je má v poloze *trans* (Obr. č. 10, Obr. č. 11). V největším množství se vyskytuje ve vysokoprocenní čokoládě, dále v čaji, ovoci



(např. v jablkách, pomerančích, hruškách či lesním ovoci), zelenině nebo v obilovinách. Nedávné studie ukázaly, že epikatechin chrání lidské zdraví svými výraznými antioxidačními a protizánětlivými účinky. Jeho vlivem dochází k prevenci diabetu a zmírnění symptomů kardiovaskulárních a cerebrovaskulárních onemocnění. Mezi jeho další účinky patří zvyšování svalové výkonnosti a pozitivní vliv na nervový systém. Epikatechin se zdá mít rovněž chemopreventivní a protinádorové účinky. Vykazuje taktéž baktericidní účinek na patogenní orální bakterie. <sup>(41,42,43)</sup>

Navzdory jeho širokému spektru pozitivních biologických účinků není epikatechin příliš stabilní a má nízkou BD (pomalá absorpce, silná metabolizace, rychlá eliminace ze systémové cirkulace). Tyto faktory omezují jeho možnosti užívání *in vivo*. V posledních letech ovšem přibývá studií věnujících se zlepšení BD epikatechinu za využití nanočástic. <sup>(41,42,43)</sup>

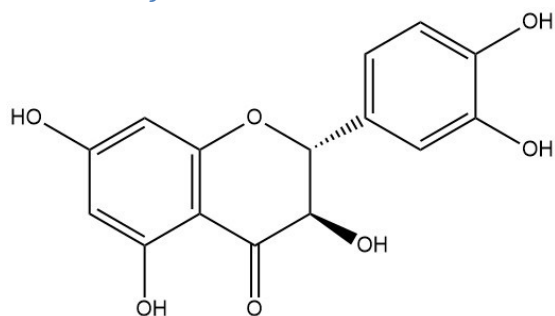
### 4.3.3 FLAVANONOLY



Obrázek č. 12: Obecná chemická struktura flavanonolů (3-hydroxy-2-fenyl-2,3-dihydrochromen-4-on)

Flavanonoly, také zvané dihydroflavonoly, se od flavanolů liší ketoskupinou v poloze C4 (Obr. č. 12). Tato skupina flavonoidů disponuje mnoha zdraví prospěšnými účinky. Byly u nich popsány účinky kardioprotektivní, hepatoprotektivní a protizánětlivé. Tyto látky dle studií také prokázaly účinek proti tuberkulóze, účinek antiamyloidogenní a antiangiogenní. Flavanonoly jsou nejčastěji izolované z citrusů (pomerančů, citronů) nebo kaka a výrobků z něj. <sup>(44,45)</sup>

#### 4.3.3.1 Taxifolin



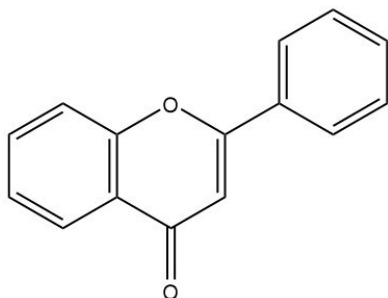
Obrázek č. 13: Chemická struktura taxifolinu ((2R,3R)-2-(3,4-dihydroxyfenyl)-3,5,7-trihydroxy-2,3-dihydrochromen-4-on)

Taxifolin, též známý jako dihydrokvercetin, je flavanonol, který lze nalézt v mnoha složkách naší stravy, například v olivovém oleji, v citrusích, v révě vinné či v cibuli. Jeho obsah je významný také v ostropestřci mariánském či v semenech tamarindu. Od základní flavanonolové struktury se jeho molekula liší hydroxylovými skupinami v polohách C5, C7, C3' a C4' (Obr. č. 13).<sup>(46)</sup>

Tento silný antioxidant disponuje širokým spektrem prospěšných biologických vlastností. Prokázal účinnost proti zánětu, kardiovaskulárním onemocněním, onemocněním jater, oxidativnímu stresu, Alzheimerově chorobě (ACH) a mikrobiálním infekcím. Taxifolin prokázal také schopnost zvýšit účinnost některých antibiotik účinných proti kmenu *Streptococcus aureus* rezistentnímu na meticilin (MRSA), což by mohlo vést ke zlepšení terapie onemocnění jím způsobených. Při každodenním užívání je popisován jeho účinek na zvýšení obranyschopnosti organismu. Významné jsou především jeho protirakovinné účinky. S nízkými až žádnými vedlejšími účinky na normální zdravé buňky taxifolin prevenuje nástup angiogeneze, snižuje aktivitu enzymů cytochromu P450 a P-glykoproteinu, neutralizuje reaktivní formy kyslíku (ROS) a spouští apoptózu.<sup>(46)</sup>

Taxifolin je považován za jeden z nejbezpečnějších flavonoidů. Studie prokazují, že tento dihydroflavonol nezpůsobuje žádné škodlivé vedlejší účinky. Díky tomu by v praxi mohl nahradit některé již používané flavonoidy.<sup>(47)</sup>

#### 4.3.4 FLAVONY



Obrázek č. 14: Obecná chemická struktura flavonů; flavon (2-fenylchromen-4-on)

Typickým strukturálním prvkem flavonů je dvojná vazba mezi uhlíky v polohách C2 a C3 a ketoskupina v poloze C4 (Obr. č. 14). Díky O-glykosylaci, C-glykosylaci a O-methylaci a acetylaci roste jejich strukturální diverzita, díky níž je tato skupina flavonoidů jednou z nejpočetnějších. Ve větší míře můžeme flavony nalézt i v běžně konzumovaných potravinách, jako jsou petržel, celer, zelí, mrkev, pšeničné klíčky, čaj a heřmánek. <sup>(48)</sup>

Tyto látky se, jako i jiné skupiny flavonoidů, vyznačují svými antioxidačními, antiproliferativními, protinádorovými, antimikrobiálními a protizánětlivými účinky. Flavony ovšem disponují také estrogenní či acetylcholinesterázovou aktivitou. Studie prokázaly pozitivní vliv flavonů na onemocnění související s oxidativním stresem, mezi něž se řadí většina metabolických onemocnění (např. aterosklerosa, diabetes), nádorová onemocnění či Alzheimerova choroba. <sup>(49)</sup>

Flavony přijímané potravou mají nejčastěji formu glykosidu. Aby se mohly vstřebat z trávicího traktu, musí se zde nejprve hydrolyzovat na příslušné aglykony. Po absorpci následuje metabolizace, přičemž nejčastější metabolity nalezené v lidské plazmě a moči jsou glukuronidy a sulfáty. Flavony mají, stejně jako většina flavonoidů, nízkou biodostupnost. U těchto látek bylo navíc zpozorováno, že po metabolizaci ve střevní stěně podléhají částečně efluxu zpět do střevního lumen, což ještě více jejich BD snižuje. <sup>(50)</sup>

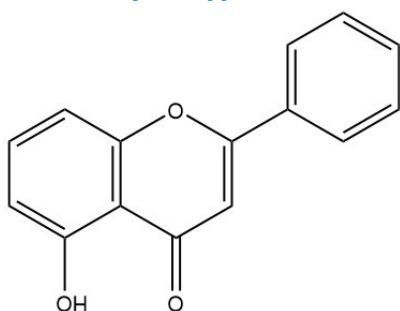
##### 4.3.4.1 Flavon

Flavon je základní strukturální jednotkou všech ostatních flavonů (Obr. č. 14). Ve svém nehydroxylovaném stavu byl nalezen v několika bylinách a dřevinách (např. *Tilia tomentosa*, *Grindelia camporum*, *Artemisia monosperma*, *Primula denticulata*, *Primula turkestanica*, *Primula veris*, *Coriandrum sativum*, *Chrysanthemum morifolium*, *Asphodeline globifera*,

*Brucea javanica*).<sup>(51)</sup> Ve své struktuře obsahuje pouze dvě funkční skupiny – hydroxylovou a etherovou.

Do jeho spektra účinku spadá antioxidační a na dávce závislá protinádorová aktivita. V *in vitro* testech prokázal svou účinnost proti buněčné linii lidské rakoviny tlustého střeva HT-29. Na tyto buňky působil nejpravděpodobněji změnou exprese genů, o kterých je známo, že hrají klíčovou roli v apoptóze, diferenciaci a proliferaci. Podobný účinek na rakovinné buňky tlustého střeva se díky schopnosti hromadit se v nich objevil také *in vivo*. Jako mechanismus účinku se ukázala být indukce apoptózy aktivací kaspázy 3, produkcí ROS a zvýšením hladin proteinu P21.<sup>(52)</sup> Tento flavonoid také působí jako kompetitivní agonista pro arylový uhlovodíkový receptor, což znamená, že se chová jako antiestrogenní flavonoid působící bez vazby na estrogenový receptor.<sup>(53)</sup> Jako jedna z hlavních účinných látek byly *Primula macrophylla* (Primulaceae) je zodpovědný za její účinek a aktivitu proti leishmanióze a fungálním infekcím.<sup>(54)</sup>

#### 4.3.4.2 5-hydroxyflavon



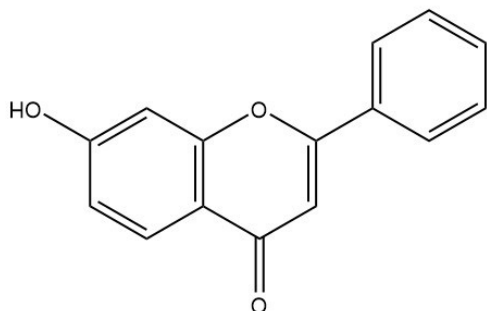
Obrázek č. 15: Chemická struktura 5-hydroxyflavonu (5-hydroxy-2-fenylchromen-4-on)

5-hydroxyflavon (5HF), někdy označovaný jako primuletin, je hydroxylovaný flavon přírodně se vyskytující v rostlině *Primula denticulata* a v mnoha dalších rostlinách patřících do rodu *Primula* a rodu *Dionysia*.<sup>(55,56)</sup>

Kvůli své monohydroxylové struktuře (Obr. č. 15) se tento flavon nevyznačuje významnou antioxidační aktivitou, což koreluje s jeho nízkou schopností vychytávat volné radikály a nízkou protirakovinnou aktivitou. Na druhou stranu má 5-hydroxyflavon vysokou antagonistickou aktivitu na androgenní receptor, čehož by se dalo využít v rámci terapie rakoviny prostaty. Jeho hydroxylová skupina v poloze C5 mu umožňuje interagovat

s ATP-senzitivními a vápníkem řízenými draslíkovými kanály. V důsledku toho vykazuje tento flavonoid signifikantní vazorelaxační účinky. <sup>(56,57)</sup>

#### 4.3.4.3 7-hydroxyflavon

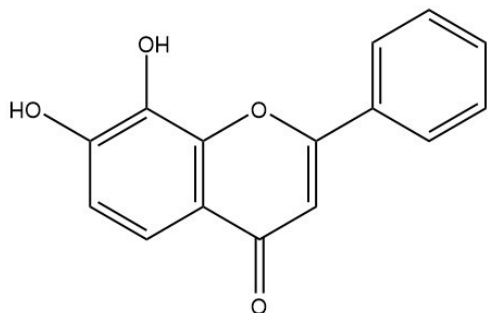


Obrázek č. 16: Chemická struktura 7-hydroxyflavonu (7-hydroxy-2-fenylchromen-4-on)

Tento flavon obsahuje jednu hydroxylovou skupinu, a to na kruhu A (Obr. č. 16). V přírodě jej můžeme najít v tropických rostlinách *Clerodendrum phlomoides*, *Muntingia calabura*, v asijském keři *Astragalus microcephalus* a v několika dalších. <sup>(58)</sup>

7-hydroxyflavon vykazuje antioxidační a protizánětlivou aktivitu. Jelikož má ale tato látka na kruhu B pouze jednu hydroxylovou skupinu, je tato aktivita nízká. <sup>(59,60)</sup> Některé studie na zvířatech prokázaly jeho příznivé ovlivnění ischemicko-reperfuzního poškození myokardu vzniklého po úspěšné kardiopulmonální resuscitaci a obnovení spontánní cirkulace po srdeční zástavě. Výsledky studie vedené na potkaních modelech prokázaly, že předléčení 7-hydroxyflavonem poskytuje kardioprotekci prostřednictvím potlačení zánětu a modulace signální dráhy MAPK/NF-KB. <sup>(59)</sup> Dle jiné studie může 7-hydroxyflavon sloužit jako forma terapie pacientů nakažených enterovirem 71, který způsobuje tzv. syndrom ruka-noha-ústa. Tento flavon vykazoval silné inhibiční účinky na replikaci zmíněného viru, což jej činí vhodným kandidátem pro prevenci a léčbu této virové infekce. <sup>(61)</sup>

#### 4.3.4.4 7,8-dihydroxyflavon

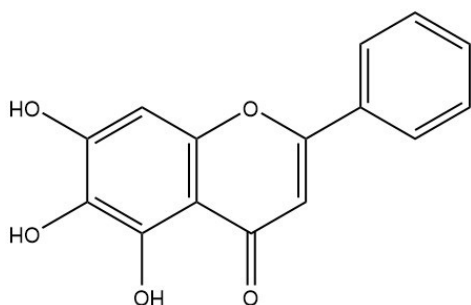


Obrázek č. 17: Chemická struktura 7,8-dihydroxyflavonu (7,8-dihydroxy-2-fenylchromen-4-on)

7,8-dihydroxyflavon obsahuje ve své struktuře 2 hydroxyskupiny v polohách C7 a C8 (Obr. č. 17). Tento přirozeně se vyskytující flavon je produkován mnoha rostlinami, včetně byliny *Tridax procumbens* a dřeviny *Godmania aesculifolia*. O výzkum této látky roste zájem především kvůli její vysoké biodostupnosti po perorálním podání a kvůli její schopnosti procházet hematoencefalickou bariérou. <sup>(62)</sup>

Nedávné studie odhalily neuroprotektivní roli tohoto pleiotropního flavonoidu vůči mnoha neurologickým poruchám a poškozením. Na zvířecích modelech se prokázal být účinný proti několika onemocněním nervové soustavy včetně Alzheimerovy, Parkinsonovy (PCH) a Huntingtonovy choroby. Kromě toho prokázal i ochranný účinek vůči toxiny indukovanému poškození mozku a nervových buněk. Tento rostlinný metabolit má také antidepressivní a antineoplastické účinky a mnoho dalších účinků spojených s jeho antiapoptotickou, antioxidační a protizánětlivou aktivitou. <sup>(63,64)</sup>

#### 4.3.4.5 Baikalein



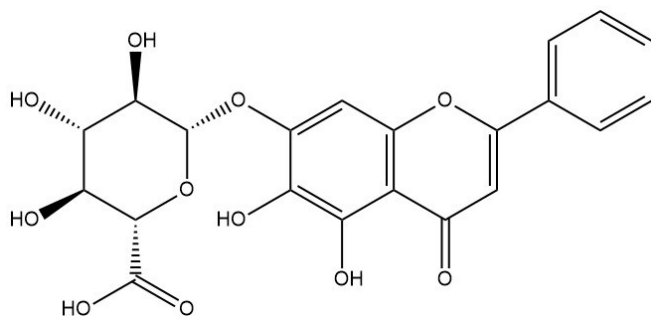
Obrázek č. 18: Chemická struktura baikaleinu (5,6,7-trihydroxy-2-fenylchromen-4-on)

Baikalein je významná flavonoidní látka obsahující ve své struktuře 3 hydroxylové skupiny na kruhu A v polohách C5, C6 a C7 (Obr. č. 18). Získává se především z kořene šiřáku

bajkalského patřícího do čeledi hluchavkovité. Tato rostlina je pro své léčivé účinky jednou ze základních bylin tradiční čínské medicíny. <sup>(65)</sup>

Baikalein má pleiotropní účinek na lidské zdraví. Stejně jako i jiné flavonoidy disponuje tento flavon účinky antioxidantními, protizánětlivými, protirakovinnými, antivirovými (např. Influenza A, COVID-19), antitrombotickými, antidiabetickými, kardioprotektivními, hepatoprotektivními i neuroprotektivními (u PCH, ACH, ischemické i hemoragické cévní mozkové příhody, věkem poškozené paměti a sklerosy byla aktivita potvrzena na *in vivo* modelech). Baikalein má ovšem i svá specifika. Vykazuje ochranný účinek na oko a působí pozitivně na ulcerózní kolitidu. Jeho spektrum účinku zahrnuje také anxiolytické, antikonvulzivní a mírně sedativní účinky. <sup>(66,67)</sup> Navzdory jeho vynikajícím účinkům na lidské zdraví a nízké toxicitě má baikalein nízkou BD *per os*, což prozatím znemožňuje jeho plnohodnotné využití v terapii. <sup>(65)</sup>

#### 4.3.4.6 Baikalin

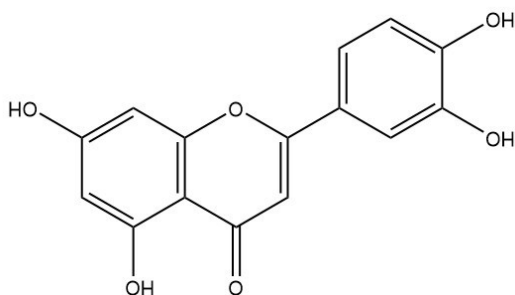


Obrázek č. 19: Chemická struktura baikalinu ((2S,3S,4S,5R,6S)-6-(5,6-dihydroxy-4-oxo-2-fenylchromen-7-yl)oxy-3,4,5-trihydroxyoxan-2-karboxylová kyselina)

Baikalin je flavon složený z aglykonu baikaleinu a kyseliny glukuronové. Ta je na aglykonovou strukturu navázána přes hydroxylovou skupinu v poloze C7 (Obr. č. 19). Stejně jako baikalein, je i baikalin k nalezení především v šišáku bajkalském. Přestože mají baikalein a baikalin zjevné strukturální shody a při metabolismu v těle jsou schopni se navzájem přeměňovat, mohou mít rozdílné účinky na savčí buňky. <sup>(68)</sup> Baikalinu se sice připisují pozitivní účinky srovnatelné s baikaleinem, ovšem ty se často liší svou silou. Baikalein má vyšší antioxidantní a chelatační účinky a je účinnější při snižování proliferace buněčné linie kolorektálního karcinomu, zatímco baikalin vykazuje vyšší protinádorový účinek na buněčné linie rakoviny močového měchýře. <sup>(69)</sup>

Aby se mohl baikalín absorbovat skrz střešní stěnu, musí být nejprve pomocí střešních enzymů a bakterií hydrolyzován na aglykon. Ten poté v systémové cirkulaci podléhá konjugaci a přeměňuje se opět na baikalín. Předpokládá se, že cirkulující baikalín znovu vstupuje do gastrointestinálního traktu prostřednictvím mechanismu biliární exkrece. Tento systém udržuje rovnováhu systémových hladin jak baikalínu, tak jeho aglykonu baikaleínu. <sup>(68)</sup>

#### 4.3.4.7 Luteolin



Obrázek č. 20: Chemická struktura luteolinu (2-(3,4-dihydroxyfenyl)-5,7-dihydroxychromen-4-on)

Luteolin je flavon obsahující ve své struktuře čtyři hydroxylové skupiny v polohách C5, C7, C3' a C4 (Obr. č. 20). Je hojně zastoupený v potravinách vyskytujících se v naší stravě. Nejčastěji jej najdeme v zelenině (brokolice, mrkev, artyčok, zelí, petržel, celer, cibulové listy, paprika, okurka, kapary, hlávkový salát, ...). V hojné míře je zastoupen také v ovoci (jablko, granátové jablko, citron) a v bylinách (bazalka, máta peprná, tymián, rozmarýn, oregano, třezalka). <sup>(70,71)</sup>

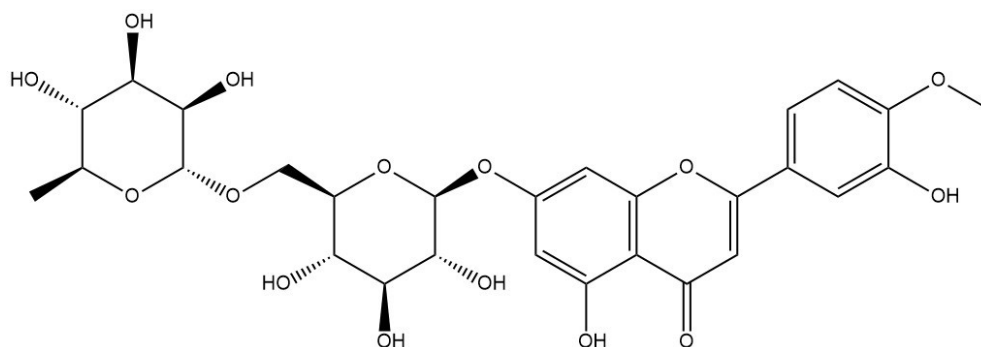
Dle provedených studií má prokázané antimikrobiální, kardioprotektivní, antidiabetické, antialergické, chemopreventivní a chemoterapeutické účinky. Proti rakovině působí prostřednictvím indukce apoptózy a zástavy buněčného cyklu a inhibicí angiogeneze a vzniku metastáz. Díky velmi vysoké antioxidační a protizánětlivé aktivitě a schopnosti procházet hematoencefalickou bariérou jsou u luteolinu významné jeho neuroprotektivní vlastnosti. Studie na buněčných a zvířecích modelech ukazují jeho pozitivní vliv na ACH, PCH a kognitivní pokles související s diabetem. Jiné studie poukazují na jeho schopnost zmírnit sekundární poškození mozku vyvolané traumatickým poraněním mozku nebo na jeho možné využití jako adjuvans při léčbě roztroušené sklerozy. Otevřená studie na dětech trpících poruchou autistického spektra (ASD) ukázala, že perorálně podávaný luteolin v kombinaci



s kvercetinem má pozitivní vliv na zmírnění symptomů ASD bez větších nežádoucích účinků.

(70,71)

#### 4.3.4.8 Diosmin



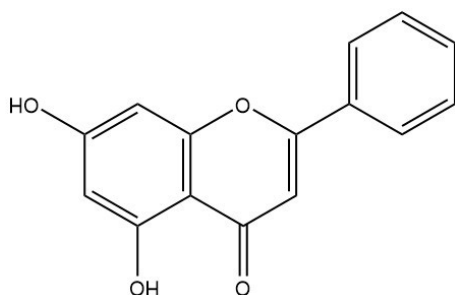
Obrázek č. 21: Chemická struktura diosminu (5-hydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyfenyl)-7-[[2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-[[[(2R,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxychromen-4-on)

Diosmin je flavonoid v přírodě se vyskytující nejčastěji v čeledi Rutaceae. Jako flavonový analog hesperidinu se ovšem nejčastěji získává jeho dehydrogenací. Strukturu diosminu tvoří aglykon diosmetin, na který je skrze hydroxylovou skupinu v poloze C7 navázaná rutinosa (Obr. č. 21).<sup>(72)</sup>

Diosmin vykazuje mnoho žádoucích účinků včetně antidiabetického, antihyperlipidemického, protizánětlivého, antioxidačního, kardioprotektivního, protinádorového, antifibrotického a pozitivního účinku na neuropatickou bolest.<sup>(72)</sup> Nejvíce je ovšem používán pro své flebotonické účinky, díky nimž působí jako venofarmakum a vazoprotektivum. Jeho účinnost potvrdily kontrolované dvojitě zaslepené klinické studie. Nyní se ve formě volně prodejných léčiv či léčiv na recept používá při léčbě známek a příznaků zjištěného chronického venózního onemocnění a při léčbě akutního hemoroidálního onemocnění.<sup>(73)</sup>

Diosmin se po perorálním podání v tlustém střevě hydrolyzuje bakteriemi střevní mikroflóry na jeho aglykon diosmetin, který pasivní difuzí prochází skrze střevní stěnu. Biodostupnost diosminu je nízká, ale zvyšuje se jeho mikronizací.<sup>(72,73)</sup>

#### 4.3.4.9 Chrysin



Obrázek č. 22: Chemická struktura chrysinu (5,7-dihydroxy-2-fenylchromen-4-on)

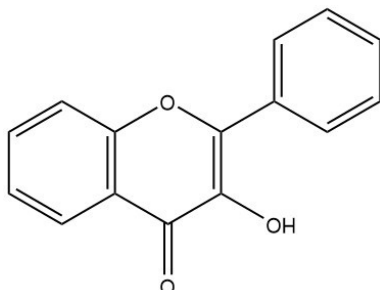
Chrysin je přírodně se vyskytující látka, jejíž základní flavonová struktura je obohacena o dvě hydroxylové skupiny v polohách C5 a C7 (Obr. č. 22). Tento flavon má sice mnoho přírodních zdrojů, ale v největším množství se nachází v propolisu, medu, v rostlinách z čeledi mučenkovité, v šišáku bajkalském a v hlívě ústřičné. <sup>(74)</sup>

Mnoho studií poukazuje na možné významné pozitivní účinky chrysinu na lidský organismus. Nejčastěji jsou zmiňovány účinky protirakovinné, které se zdají být závislé na dávce. Kladný vliv chrysinu byl pozorován u mnoha typů rakovinného bujení, včetně kolorektálního, renálního, hepatálního či u melanomu nebo rakoviny prsu. Jeho účinky jsou spojené jak se zpomalením růstu tumorů, tak se zpomalením jejich metastázování díky snížení buněčné proliferace, indukci buněčné smrti apoptózou a protizánětlivému účinku. Působí také synergisticky s doxorubicinem a cisplatinou. Mezi jeho další významné účinky patří antidiabetické, antioxidační, antialergické, neuroprotektivní, hepatoprotektivní a renoprotektivní účinky. Je mu také přisuzován pozitivní účinek na kardiovaskulární systém. V několika studiích byl popisován dobrý vliv na reprodukční systém, a to u mužů (zvýšení počtu a kvality spermií díky potenciálu navýšit hladiny testosteronu) i žen (zvýšení počtu rostoucích ovariálních folikulů). <sup>(74,75)</sup>

Díky povaze své struktury je chrysin po perorálním podání slabě absorbován a naopak silně metabolizován a vylučován z těla. Jen malé množství metabolitů (zejména chrysin-glukuronát a chrysin-sulfát) bylo nalezeno v plazmě a moči. Hlavní cestou eliminace se proto zdá být vyloučení stolicí, do které se dostává pomocí biliární exkrece. Biologická dostupnost chrysinu se dá zvýšit jeho enkapsulací. Testované nosičové systémy zahrnovaly lipozomy, micely a polymerní nanočástice. Právě polymerní nanočástice složené zejména

z kyseliny polymléčné-glykolové (PLGA) a polyethylenglykolu (PEG) zlepšovaly BD chrysinu a tím i jeho terapeutický účinek. <sup>(75)</sup>

#### 4.3.5 FLAVONOLY



Obrázek č. 23: Obecná chemická struktura flavonolů; 3-hydroxyflavon (3-hydroxy-2-fenylchromen-4-on)

Skupina flavonolů je charakteristická chemickou strukturou sestávající ze základního skeletu flavonoidů, dvojně vazby mezi uhlíky C2 a C3, hydroxylové skupiny v poloze C3 a ketoskupiny v poloze C4 (Obr. č. 23). Tato struktura se označuje jako 3-hydroxyflavon a jsou od ní odvození veškerí ostatní zástupci této skupiny. Flavonoly se považují za flavonoidy s nejvyšší antioxidační aktivitou právě díky svému základnímu skeletu, který řadou rezonančních struktur poskytuje stabilnější molekulu, než mají ostatní skupiny flavonoidů. <sup>(60)</sup>

Ačkoli flavonoidy najdeme prakticky ve všech druzích ovoce a zeleniny, v největším množství se nachází v cibuli, jablkách, hroznovém víně, moštu a víně. <sup>(76)</sup> Flavonoly se považují za UV a fotoprotektory, jelikož silně absorbují světlo v oblastech vlnových délek UV-A i UV-B. <sup>(77)</sup> Díky svým vysokým antioxidačním vlastnostem mají cenné terapeutické účinky. Flavonoly působí velmi pozitivně na kardiovaskulární systém díky své vazodilatační, antitrombotické a antiatherosklerotické aktivitě. Tyto látky hrají také roli v boji proti ACh, a to nejen díky antioxidační aktivitě, ale také kvůli inhibičnímu účinku na enzymy acetylcholinesterasa a butyrylcholinesterasa. Různými biochemickými cestami také mohou působit proti nádorovým onemocněním. <sup>(60,76)</sup>

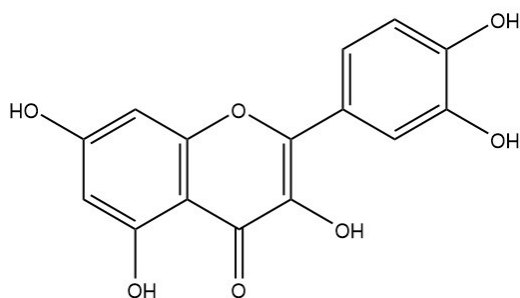
Jelikož flavonoly přijímáme v potravě nejčastěji jako různé glykosidy, musí se stejně jako ostatní flavonoidy nejprve hydrolyzovat na aglykony, které poté pasivní difuzí prochází

přes střevní stěnu a následně podléhají při metabolizaci konjugaci. Nejčastější konjugáty flavonolů vyskytující se v plazmě jsou glukuronidy a sulfáty. <sup>(78)</sup>

#### 4.3.5.1 3-hydroxyflavon

3-hydroxyflavon je syntetická látka, která je základní strukturální jednotkou flavonolů a zároveň jejich nejjednodušší zástupce. Má jen jednu hydroxylovou skupinu, a to na uhlíku číslo 3 (Obr. č. 23). Díky jeho velkému počtu rezonančních struktur je 3-hydroxyflavon vysoce stabilní. <sup>(79)</sup> Ve vodě je velmi těžce rozpustný až prakticky nerozpustný. Jeho biologická dostupnost se dá ovšem zvýšit enkapsulací do cyklodextrinových molekul. <sup>(80,81)</sup> Díky schopnosti přejít do tautomerické formy emituje záření o dvou vlnových délkách ( $\lambda_{\max} \approx 524 \text{ nm}$  – zelená barva,  $\lambda_{\max} \approx 400 \text{ nm}$  – modrofialová barva). Využívá se proto jako fluorescenční sonda pro studium membrán, mezimembránových proteinů i jiných struktur. <sup>(81)</sup>

#### 4.3.5.2 Kvercetin



Obrázek č. 24: Chemická struktura kvercetinu (2-(3,4-dihydroxyfenyl)-3,5,7-trihydroxychromen-4-on)

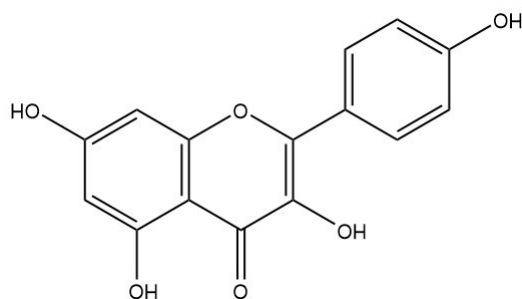
Kvercetin je jedním z nejúčinnějších a nejrozšířenějších bioflavonoidů, které se nacházejí v ovoci a zelenině. Nejlepšími přírodními zdroji kvercetinu jsou bezinky, pohanka, červená a bílá cibule, brusinky, pálivé papričky, kapusta, borůvky, jablka a hrušky. Tento oblíbený flavonol lze také běžně najít v lékárnách jako doplněk stravy přispívající k normální funkci imunitního systému. <sup>(60,82)</sup>

Kvercetin vykazuje nejvyšší antioxidační aktivitu ze všech flavonolů a používá se proto jako standardní sloučenina v testech antioxidační aktivity. Jedna z jeho nejvýznamnějších předností je jeho pozitivní vliv na kardiovaskulární systém. Tato látka má nespočet prospěšných účinků zahrnujících vazodilatační účinky, redukci počtu adhezivních molekul

a dalších zánětlivých markerů, ochranu cév před oxidačním stresem, antiagregační účinky a inhibici oxidace LDL cholesterolu. Kromě toho působí také ochranně vůči oxidativnímu a zánětlivému poškození neuronů, má antialergické a antivirové účinky a hraje důležitou roli v boji proti stárnutí a poškození organismu volnými radikály. <sup>(76,77)</sup> Jiné studie naznačují, že kvercetin může být díky afinitě k cirkulující nádorové DNA a synergistickému účinku se syntetickými protinádorovými látkami důležitým doplňkovým lékem pro prevenci a léčbu různých typů rakoviny. <sup>(60,83,84)</sup>

Po perorálním podání kvercetinu dochází k jeho pasivní difuzi přes střevní stěnu. Pokud je podán ve formě glykosidu, musí se nejprve hydrolyzovat na aglykon. Některé kvercetinové glykosidy však využívají transport přes střevní bariéru zprostředkovanou kotransportérem sodíku a glukózy typu 1. Kvercetin je díky své 3,5,7,3',4'-pentahydroxylové struktuře (Obr. č. 24) extenzivně metabolizován v enterocytech a játrech za vzniku glukuronátů, sulfátů či methylovaných derivátů. Jen velmi malé množství kvercetinu se v plazmě vyskytuje jako aglykon. <sup>(85)</sup>

#### 4.3.5.3 Kempferol



Obrázek č. 25: Chemická struktura kempferolu (3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxyfenyl)chromen-4-on)

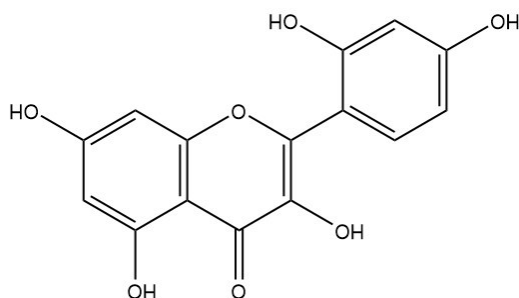
Kempferol je flavonolem bohatě zastoupeným v běžné lidské stravě. Tuto biologicky aktivní látku můžeme nalézt v mnoha druzích ovoce (např. lesní plody, jablka, hroznové víno, citrusy) a zeleniny (např. cibule, česnek, brokolice, zelené fazole, křen, ředkev, zelí, špenát), stejně jako v různých bylinách (např. třezalka, rozmarýn, řeřicha, libeček) či dřevinách (listy jinanu dvoulaločného, listy čajovníku). <sup>(86)</sup>

Podobně jako u jiných flavonoidů se i účinky kempferolu víceméně odvíjí od jeho antioxidačních a protizánětlivých aktivit, které především napomáhají v boji proti chronickým chorobám. Díky schopnosti inhibovat proteinkinasy a jaderné transkripční faktory snižuje

kempferol hladiny prozánětlivých cytokinů a naopak zvyšuje hladiny protizánětlivých cytokinů. Studie tudíž označují kempferol jako látku schopnou zpomalit degeneraci meziobratlových plotének, oddálit rozvoj artritidy či mu zabránit, pomáhat v boji proti revmatoidní artritidě nebo působit preventivně proti ethanolem vyvolaným gastrickým ulceracím. Mezi jeho další pozitivní účinky na zdraví lze zařadit hepatoprotektivní aktivitu, zmírnění příznaků metabolického syndromu a protektivní účinky na kardiovaskulární a nervovou soustavu. Tento flavonol má také účinky potenciálně využitelné pro adjuvantní léčbu nádorových onemocnění. Vykazuje proapoptotickou aktivitu, inhibuje angiogenezi a zvyšuje imunitu pacienta. Současně zvyšuje absorpci a účinek jiných protirakovinných léčiv. (84,86)

Jeho strukturální znaky zahrnují tři hydroxylové skupiny navázané na flavonolovou základní strukturu v polohách C5, C7 a C4' (Obr. č. 25). Po podání *per os* má velmi nízkou biodostupnost. Jeho slabá absorpce z intestinálního prostředí je navíc doplněna o proces efluxu zpět do střevního lumen. Absorbovaný kempferol se poté metabolizuje nejčastěji na glukuronidy, sulfáty či methylované deriváty. Jeho špatná BD by se mohla v budoucnu ovšem zlepšit pomocí nanotechnologického zpracování. (84)

#### 4.3.5.4 Morin



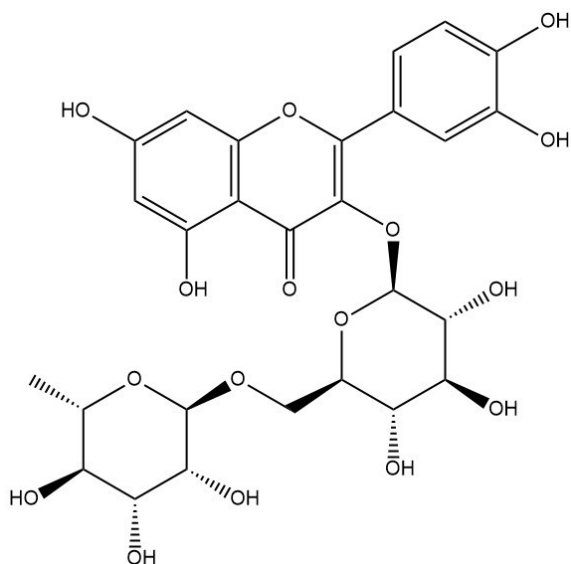
Obrázek č. 26: Chemická struktura morinu (2-(2,4-dihydroxyfenyl)-3,5,7-trihydroxychromen-4-on)

Flavonoid morin je terapeuticky účinná látka nacházející se především v čeledi Moraceae, po které nese svůj název. Najít jej ale můžeme i v čeledích Rosaceae nebo Fagaceae. Nejvýznamnější rostlinné zdroje zahrnují morušovník bílý, makluru oranžovou a barvířskou, kvajavu hruškovou, jahody, fíky, cibuli a červené víno. Svou strukturou 5,7,2',4'-tetrahydroxyflavonolu (Obr. č. 23) připomíná strukturu kvercetinu (Obr. č. 24).

Ačkoli má kvercetin vyšší antioxidační aktivitu, morin je lépe dostupný po perorálním podání a při vyšších dávkách nevykazuje oproti kvercetinu významnou toxicitu. <sup>(87)</sup>

Několik studií prokázalo velmi příznivý účinek morinu na lidské zdraví. V důsledku inhibice aktivity mnoha enzymů je tomuto flavonolu připisován antioxidační, protizánětlivý, antidiabetický, antibakteriální, hypourikemický, neuroprotektivní, kardioprotektivní a protinádorový účinek. Jelikož se při současném podání morinu s některými protinádorovými léčivy (etoposid, cisplatina, doxorubicin, metotrexát, tamoxifen) zlepšuje jejich biodostupnost a snižuje toxicita, zkoumá se jeho možné využití jako adjuvantní léčivo. Při chronickém užívání vykazuje velmi nízkou toxicitu a je dobře tolerovaný. <sup>(88)</sup>

#### 4.3.5.5 Rutin



Obrázek č. 27: Chemická struktura rutinu (2-(3,4-dihydroxyfenyl)-5,7-dihydroxy-3-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-[[[(2R,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxychromen-4-on)

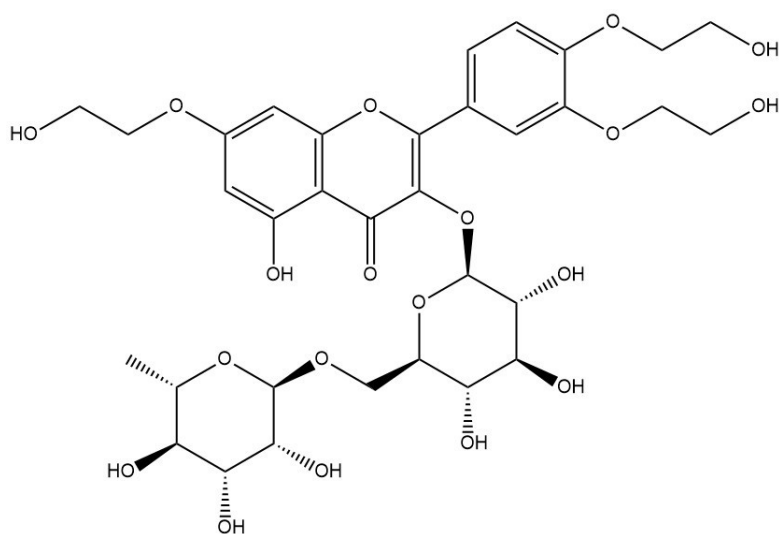
Tento komerčně běžně dostupný flavonol je rutinosidem kvercetinu (Obr. č. 27). Své jméno nese po rostlině *Ruta graveolens* a někdy bývá označován také jako vitamín P či rutosid. Jedním z nejbohatších zdrojů rutinu je pohanka, nalezneme jej ale ve velké míře také v jablkách, čaji, citrusech či mučence. Jeho dostupnost v rámci potravinových doplňků i léčivých přípravků (Ascorutin, Cyclo 3 Fort, Phlogenzym, Wobenzym) potvrzuje pozitivní vliv rutinu na lidské zdraví. Nejvíce známý je pro svůj vazoprotektivní účinek působící proti fragilitě cévní stěny. Jeho spektrum pozitivního efektu je však daleko širší. <sup>(89,90)</sup>

Souhrnně se dá říci, že má pozitivní vliv na fungování celého organismu. Především díky antioxidačním a protizánětlivým účinkům působí ochraně na centrální nervovou soustavu, kardiovaskulární soustavu, na plíce, játra, ledviny i oči. Mezi jeho další potvrzené účinky patří protirakovinný, analgetický, antiartritický, antidiabetický, antiosteoporotický a antiosteopenický účinek. Působí také proti hypercholesterolemii, hypertenzi, gastrickým ulceracím či zánětům respiračního systému. Často zmiňované jsou i jeho protimikrobní účinky. Působí antibakteriálně, antifungálně a antivirotický. Některé studie zmiňují dokonce jeho antimalarický a larvicidní účinek. <sup>(89,90,91)</sup>

Zajímavé jsou jeho příznivé účinky na kvalitu vlasů a kůže. Působí preventivně proti apoptóze vlasových folikulárních buněk, faktoru, který přispívá k nástupu plešatosti. Kůži chrání proti škodlivému UV-B záření, zmírňuje příznaky atopické dermatitidy a zlepšuje hojení ran. Ojedinelý je jeho pozitivní vliv na mužskou reprodukční soustavu, protože prokázal možnou ochrannou aktivitu na testikulární tkáň a spermie. <sup>(89,91)</sup>

Jelikož je rutin glykosid, podléhá ve střevě enzymatické a bakteriální hydrolýze. Do plazmy se tak dostane jen velmi malé až žádné množství nezměněného rutinu. Zkoumá se ale mnoho způsobů jak nanotechnologicky jeho biodostupnost vylepšit. Nejslibnější se zdá být použití polymerních nanočástic, lipidických nanočástic a molekulárních komplexů. <sup>(91)</sup>

#### 4.3.5.6 Troxerutin



Obrázek č. 28: Chemická struktura troxerutinu (2-[3,4-bis(2-hydroxyethoxy)fenyl]-5-hydroxy-7-(2-hydroxyethoxy)-3-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-[(2R,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxychromen-4-on)



Troxerutin, neboli trihydroxyethylrutin či vitamín P4, je semisyntetický derivát rutinu. Vzniká navázáním dihydroxyethylových skupin na C7, C3' a C4' rutinu skrze hydroxylové skupiny (Obr. č. 28). Vzniklý derivát je oproti rutinu polárnější, tudíž rozpustnější ve vodě a biologicky dostupnější. Po jeho absorpci nastává v játrech metabolizace na konjugáty, nejčastěji glukuronidy. Bylo u něj také prokázáno, že částečně podléhá enterohepatálnímu oběhu. Najít ho můžeme jak v doplňcích stravy, tak v léčivých přípravcích (Cilkanol, Ginkor Fort, Venoruton, Venoruton Forte). <sup>(92,93)</sup>

Troxerutinu je připisováno významné množství pozitivních účinků na náš organismus. Stejně jako ostatní flavonoidy i troxerutin působí protizánětlivě a antioxidačně. Tento flavonol má schopnost aktivovat jak neenzymatické, tak enzymatické antioxidační obranné mechanismy, čímž snižuje rizika spojená s oxidačním poškozením tkání. Zmíněné účinky se podílí na jeho dalších zkoumaných benefitech, mezi které patří snížení rizik spojených s metabolickým syndromem či protinádorová aktivita. Studie poukazují také na jeho účinky snižující poškození zdravých buněk při radioterapii. Mezi další příznivé účinky troxerutinu patří kardioprotektivní, hepatoprotektivní, renoprotektivní, neuroprotektivní a protinádorový účinek. Ve studii na potkaních modelech byl pozorován vliv na diabetické poškození organismu. Tato studie ukázala, že troxerutin u potkanů zvýšil hladinu testosteronu, snižoval diabetem zprostředkované strukturální poškození varlat a podporoval počet, pohyblivost a životaschopnost spermií. <sup>(93,94)</sup>

## 5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 5.1 MATERIÁL

- mikrotitrační destičky – 96 jamek (Brand, Německo)
- mikrozkuřavky: 1,5 ml; 5,0 ml (Eppendorf, Německo)
- automatické jednokanálové pipety: 10 – 100  $\mu$ l, 20 – 200  $\mu$ l, 100 – 1000  $\mu$ l (Brand, Německo)
- vícekanálová pipeta: 30 – 300  $\mu$ l (Biohit, Německo)
- špičky k pipetám o objemu 100 $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l (Eppendorf, Německo)

### 5.2 PŘÍSTROJE

- spektrofotometr pro mikrotitrační destičku Hidex Sense (HIDEX, Turku, Finsko)
- analytické váhy Kern ALT 220-4NM (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)
- vortex mixér IKA® Vortex Genius 3 (IKA®- Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Německo)
- třepačka pro mikrotitrační destičky IKA® MS 3 digital (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Německo)
- ultrazvuková vana Bandelin Sonorex (BANDELIN electronic GmbH, Berlin, Německo)
- pH metr WTW 538 (WTW, měřicí a analytická technika, s.r.o., Praha, ČR)

### 5.3 CHEMIKÁLIE

- $\alpha$ -glukosidasa (3.2.1.20) ze *Saccharomyces cerevisiae* – Sigma (St. Louis, MO USA)
- akarbosa – Sigma (St. Louis, MO USA)
- *p*-nitrofenyl  $\alpha$ -D-glukopyranosid (pNPAG) – Sigma (St. Louis, MO USA)
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O – Sigma (St. Louis, MO USA)
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O – Penta (ČR)
- rozpouštědla
  - dimethylsulfoxid (DMSO) – Lach-Ner (ČR)
  - superčistá voda připravena pomocí přístroje Milli-Q RG (Merck Millipore, Massachusetts, USA)

Všechny použité chemikálie jsou čistoty p.a. (pro analýzu).

## 5.4 TESTOVANÉ LÁTKY

### Flavanony

- Naringenin
- Naringin
- Hesperetin
- Hesperidin

### Flavanoly

- Katechin
- Epikatechin

### Flavanonoly

- Taxifolin

### Flavony

- Flavon
- 5-hydroxyflavon
- 7-hydroxyflavon
- 7,8-dihydroxyflavon
- Baikalein
- Baikalin
- Luteolin
- Diosmin
- Chrysin

### Flavonoly

- 3-hydroxyflavon
- Kvercetin
- Kempferol
- Morin
- Rutin
- Troxerutin

Všechny testované látky byly zakoupeny od společnosti Sigma (St. Louis, MO USA) a jsou čistoty p.a.

## 5.5 STATISTICKÁ ANALÝZA A VYUŽÍVANÉ PROGRAMY

- Pro spektrofotometrické hodnocení vzorků byl využit program Hidex Sence.
- Ke zhodnocení výsledků pomocí statistické analýzy a vytvoření orientačních grafů byl použit Microsoft Excel.
- Pro konečné zhodnocení aktivity zkoumaných látek pomocí zanesení jejich inhibičních výsledků do grafů byl využit program GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, USA).
- K vytvoření veškerých chemických struktur v této práci byl použit program ChemDraw Professional 20.0.

## 5.6 METODIKA MĚŘENÍ INHIBICE $\alpha$ -GLUKOSIDASY

### 5.6.1 Příprava zásobních a pracovních roztoků

- Příprava 0,1M fosfátového pufru o pH 6,8
  - Příprava roztoku A: 3,5 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  bylo rozpuštěno v 100 ml superčisté vody.
  - Příprava roztoku B: 2,7 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  bylo rovněž rozpuštěno v 100 ml superčisté vody.
  - Smísení roztoku A a roztoku B: pro přípravu finálního fosfátového pufru o pH 6,8 bylo smíšeno 24,5 ml roztoku A a 25,5 ml roztoku B. Hodnota pH byla následně ověřena pH metrem (případně upravena pomocí 1M NaOH nebo 1M HCl).
- Příprava roztoků testovaných látek – flavonoidů
  - Do označené vialky bylo naváženo na analytických vahách adekvátní množství testované látky.
  - Navážená látka byla následně za použití automatických pipet ve vialce naředěna pomocí DMSO na roztok o požadované základní koncentraci.
  - Pro homogenizaci vzniklého roztoku byl používán vortex mixér.

- Roztok látky o základní koncentraci byl dále pomocí DMSO v připravených označených 1,5ml mikroskopických Eppendorf naředěn na nižší požadované koncentrace (10 mM – 0,0001 mM) a pokaždé řádně homogenizován na vortex mixéru.
- Do jedné označené 1,5ml mikroskopické vavky bylo napipetováno pouze 100 µl čistého DMSO.
- Příprava roztoku substrátu – pNPAG
  - Na analytických vahách bylo naváženo do označené 5,0ml mikroskopické vavky přibližně 1,8 mg *p*-nitrofenyl  $\alpha$ -D-glukopyranosidu (pNPAG), který byl následně naředěn pomocí superčisté vody na koncentraci 1,25 mM.
  - Vzniklá směs se zhomogenizovala za užití ultrazvukové vany a vortexu.
- Příprava roztoku standardu – akarbosy
  - Roztok akarbosy byl připraven vždy o jedné zvolené koncentraci v rozmezí 5 mM – 0,025 mM.
  - Postup přípravy roztoku byl shodný s postupem přípravy základního roztoku testovaných látek.
- Příprava základního roztoku enzymu –  $\alpha$ -glukosidasy
  - Na analytických vahách bylo naváženo do označené 1,5ml mikroskopické vavky dostačující množství enzymu (přibližně 1 mg).
  - Toto množství se v poměru 1:1 naředilo fosfátovým pufrům na základní roztok o koncentraci 0,625 U/ml.
  - Vzniklý roztok byl pomalým otáčením uzavřené mikroskopické vavky homogenizován.
  - Tento základní enzymový roztok byl po homogenizaci uložen do polystyrenové uzavíratelné nádoby s ledem.
  - Před každým měřením byl ze základního roztoku připraven česrtvý roztok enzymu: vzalo se 25 µl základního roztoku a smíchalo s 943 µl fosfátového pufru.

### 5.6.2 Metodický postup stanovení inhibice $\alpha$ -glukosidasy <sup>(4,5,95)</sup>

- Do označené mikrotitrační destičky bylo napipetováno multikanálovou pipetou příslušné množství pufru:

- sloupce 1, 2, 3 – 110  $\mu\text{l}$ ;
- sloupec 4 – 120  $\mu\text{l}$ .
- Následně bylo do řádků A-F napipetováno 10  $\mu\text{l}$  testované látky (testovaných látek) o příslušných koncentracích.
- Do řádku G bylo napipetováno 10  $\mu\text{l}$  akarbosy o zvolené koncentraci.
- Do jamek posledního řádku s označením H bylo napipetováno pouze 10  $\mu\text{l}$  čistého DMSO (kontrolní vzorky).
- Dalším krokem bylo přidání čerstvého roztoku enzymu o objemu 10  $\mu\text{l}$  do jamek ve sloupcích číslo 1-3 (4. sloupec = slepé vzorky).
- Do každé jamky bylo poté multikanálovou pipetou přidáno 100  $\mu\text{l}$  pufru.
- Těsně před vložením mikrotitrační destičky do spektrofotometru bylo do každé jamky přidáno za pomoci multikanálové pipety 20  $\mu\text{l}$  pNPAG.
- Následně byla spektrofotometrem v jednotlivých jamkách destičky naměřena absorbance při vlnové délce 405 nm.
- Rozdílnost v obsahu jednotlivých jamek je shrnuta v tabulce č. 2.

	Sloupec č. 1	Sloupec č. 2	Sloupec č. 3	Sloupec č. 4
Řádek A				
Řádek B				
Řádek C				
Řádek D				
Řádek E				
Řádek F				
Řádek G				
Řádek H				

	Testovaná látka č. 1 – snižující se koncentrace
	Testovaná látka č. 2 – snižující se koncentrace
	Akarbosa
	DMSO
	$\alpha$ -glukosidasa

Tabulka č. 2: Schématické znázornění jamek mikrotitrační destičky při stanovení inhibice  $\alpha$ -glukosidasy. Ve všech jamkách je 210  $\mu\text{l}$  fosfátového pufru, 20  $\mu\text{l}$  pNPAG a 10  $\mu\text{l}$  příslušné testované látky (řádek H pouze rozpouštědlo DMSO). V jamkách bez  $\alpha$ -glukosidasy je její objem 10  $\mu\text{l}$  nahrazen fosfátovým pufrem.

## 6. VÝSLEDKY

### 6.1 Matematické stanovení výsledků

Data získaná z programu Hidex Sence byla zpracována v programu Microsoft Excel. Spektrofotometrické měření inhibice enzymatické aktivity probíhalo po dobu 6 minut, aby bylo možné odfiltrout případný vliv absorbance testovaných látek.

Kinetika enzymatické reakce byla lineární. Díky tomu bylo možné pomocí lineární regrese stanovit směrnice přímků vztahu mezi absorbancí a časem odpovídající enzymatické reakci. Ze získaných směrnic byla dle Rovnice č.1 vypočítaná míra inhibice enzymu pro negativní vzorek (pouze rozpouštědlo, tj. maximální rychlost enzymatické reakce), pozitivní kontrolu (akarbosu) a danou testovanou látkou o zvolené koncentraci. Konečný výsledek byl stanoven jako průměr ze tří hodnot míry inhibice  $\pm$  směrodatná odchylka vypočítaná dle Rovnice č.2.

$$x[\%] = 1 - \frac{k_V - K_{VS}}{k_K - k_{KS}}$$

Rovnice č. 1

$x$  – % inhibované aktivity enzymu

$k_V$  – směrnice pro rychlost enzymatické reakce testovaného vzorku stanovená podle změny absorbance vzorku v čase

$k_{VS}$  – směrnice pro nárůst absorbance daného vzorku bez přítomnosti enzymu (slepý vzorek)

$k_K$  – směrnice maximální rychlosti enzymatické reakce (enzym + rozpouštědlo)

$k_{KS}$  – směrnice pro nárůst absorbance kontrolního vzorku bez přítomnosti enzymu (slepý vzorek) – tato hodnota byla ve všech případech 0, ale pro úplnost je zahrnuta do tohoto vzorce

$$\sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{(n - 1)}}$$

Rovnice č. 2

$x$  – % inhibované aktivity enzymu

$\bar{x}$  – průměr % inhibované aktivity enzymu z jednotlivých měření

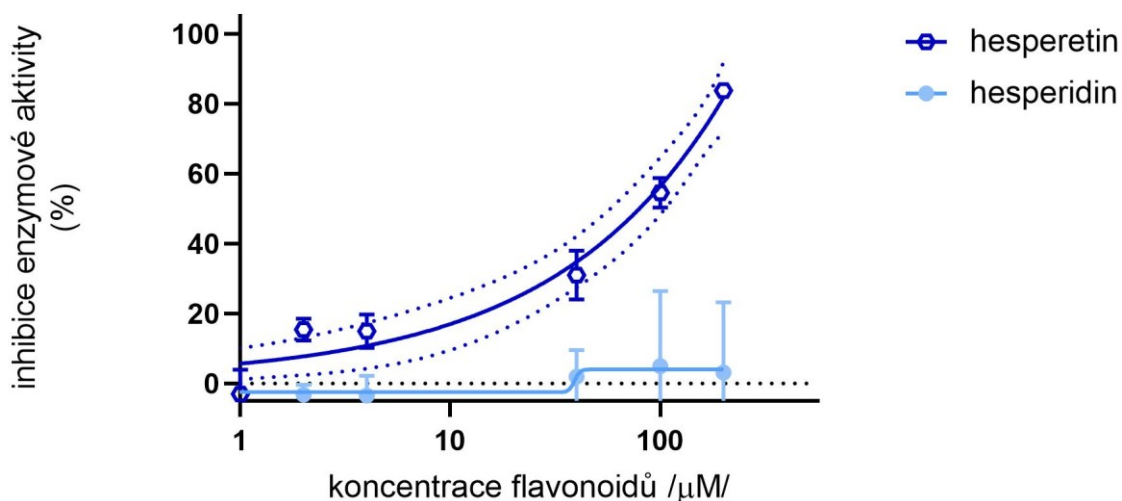
$n$  – počet hodnot

## 6.2 Statistické zhodnocení výsledků

Výsledky měření jsou zobrazeny jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka vypočítaná podle Rovnice č.2. Porovnání účinků proběhlo pomocí srovnání 95% konfidenčních intervalů křivek vztahu mezi účinkem (tj. inhibicí enzymu) a koncentrací testované látky.

## 6.3 Grafické znázornění výsledků s využitím 95% konfidenčních intervalů

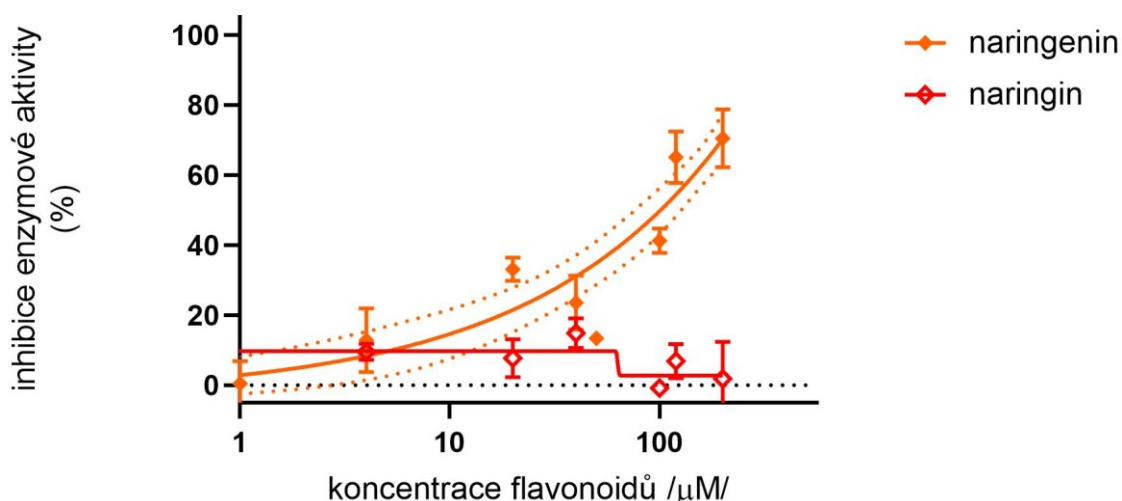
V grafech na Obr. č. 29-35 jsou zobrazeny inhibiční křivky pro všechny testované látky. Pro přesnější zhodnocení inhibiční aktivity bylo využito 95% konfidenčních intervalů. Tyto intervaly ovšem nejsou uvedené u některých látek, které akarbosu inhibovaly nedostatečně.



Obrázek č. 29: Grafické znázornění závislosti inhibiční aktivity hesperetinu a hesperidinu na jejich koncentraci s použitím 95% konfidenčních intervalů

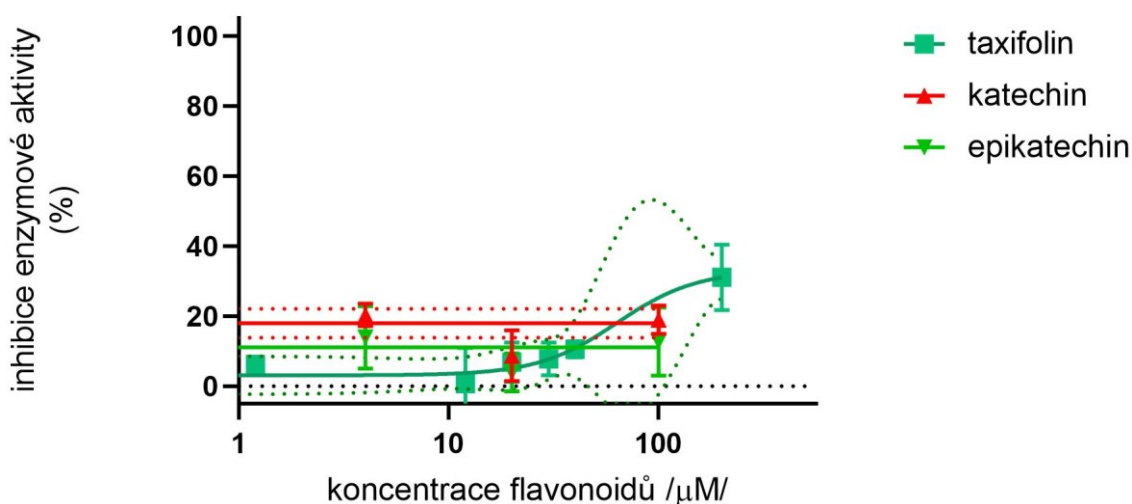
Inhibiční aktivita samotného aglykonu hesperetinu je dle Obr. č. 29 vyšší, než inhibiční aktivita glykosidu hesperidinu. Zatímco křivka hesperetinu plynule roste a při koncentraci 100  $\mu$ M má již hodnotu inhibice enzymové aktivity více než 50 %, hesperidin při této koncentraci nevykazuje téměř žádnou aktivitu. Při dvojnásobné koncentraci obou látek dochází u hesperetinu k nárůstu inhibiční aktivity na přibližně 80 %, zatímco aktivita hesperidinu stagnuje.





Obrázek č. 30: Grafické znázornění závislosti inhibiční aktivity naringeninu a naringinu na jejich koncentraci s použitím 95% konfidenčních intervalů

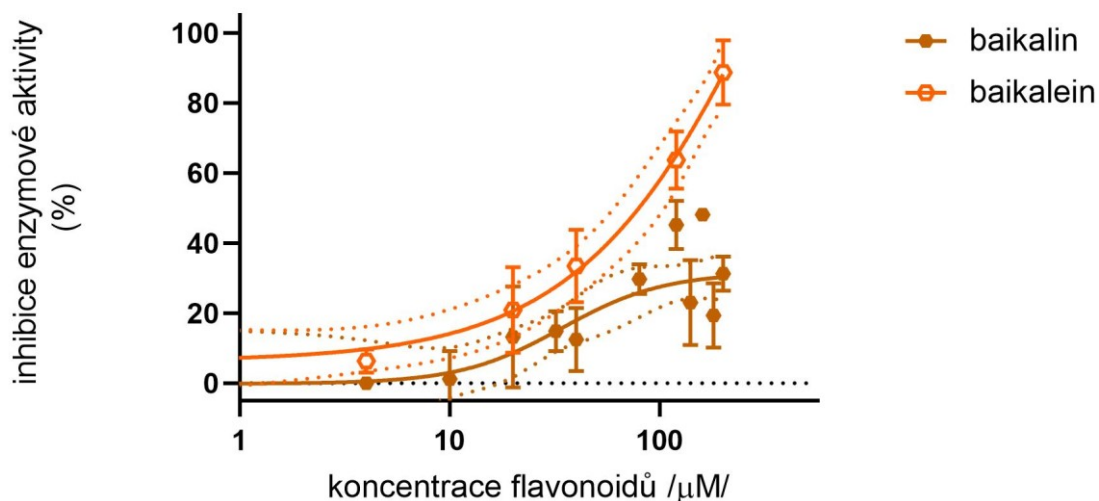
Velmi podobné schéma je možné vidět na Obr. č. 30, kde aglykon naringenin vykazuje vyšší inhibiční aktivitu než jeho glykosid naringin. I zde je tedy patrná výhoda necukerné struktury. Zatímco křivka naringeninu plynule stoupá a již v koncentraci 100  $\mu\text{M}$  má hodnotu enzymové inhibiční aktivity přibližně 50 %, křivka naringinu nestoupá a její hodnoty se pohybují v rozmezí přibližně 0-10 %.



Obrázek č. 31: Grafické znázornění závislosti inhibiční aktivity taxifolinu, katechinu a epikatechinu na jejich koncentraci s použitím 95% konfidenčních intervalů

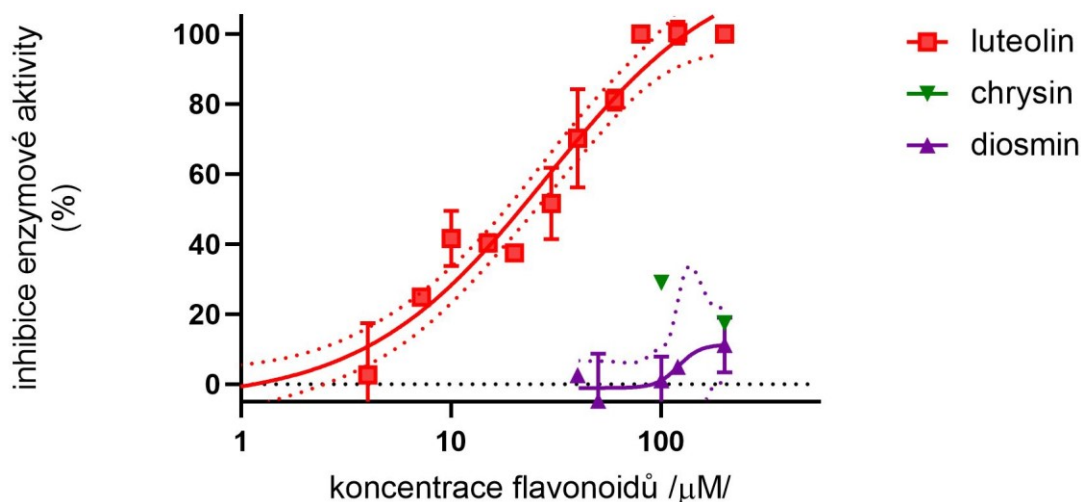
Dle Obr. č. 31 inhibiční křivky katechinu a epikatechinu s rostoucí koncentrací nenarůstají, ale zůstávají lineární. Z hlediska izomerie se zdá být mírně účinnější *trans*

uspořádání katechinu, ovšem ani jeho míra inhibiční aktivity není dostačující a pohybuje se okolo 20 %. Taxifolin, jehož struktura je až na ketoskupinu v poloze C4 totožná, má inhibiční aktivitu o něco vyšší. Jeho inhibiční křivka ovšem začíná narůstat až v koncentraci přibližně 50  $\mu\text{M}$  a její nárůst je pozvolný.



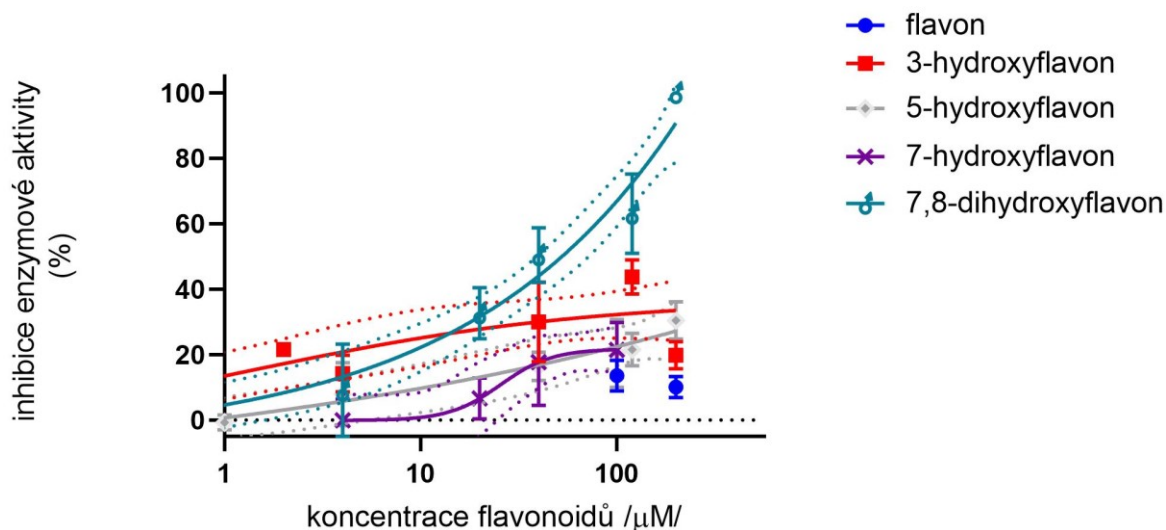
Obrázek č. 32: Grafické znázornění závislosti inhibiční aktivity baikaleinu a baikalinu na jejich koncentraci s použitím 95% konfidenčních intervalů

Také Obr. č. 32 ukazuje nevýhodu připojené glykosidové struktury na flavonoidovém aglykonu. Křivka flavonu baikaleinu dle grafického znázornění mírně převyšuje inhibiční křivku baikalinu, ovšem jejich konfidenční interval se částečně prolíná až do koncentrace přibližně 60  $\mu\text{M}$ . Inhibiční aktivita baikaleinu o koncentraci 200  $\mu\text{M}$  ale dosahuje téměř 90 %, zatímco baikalin pouze přibližně 30 %.



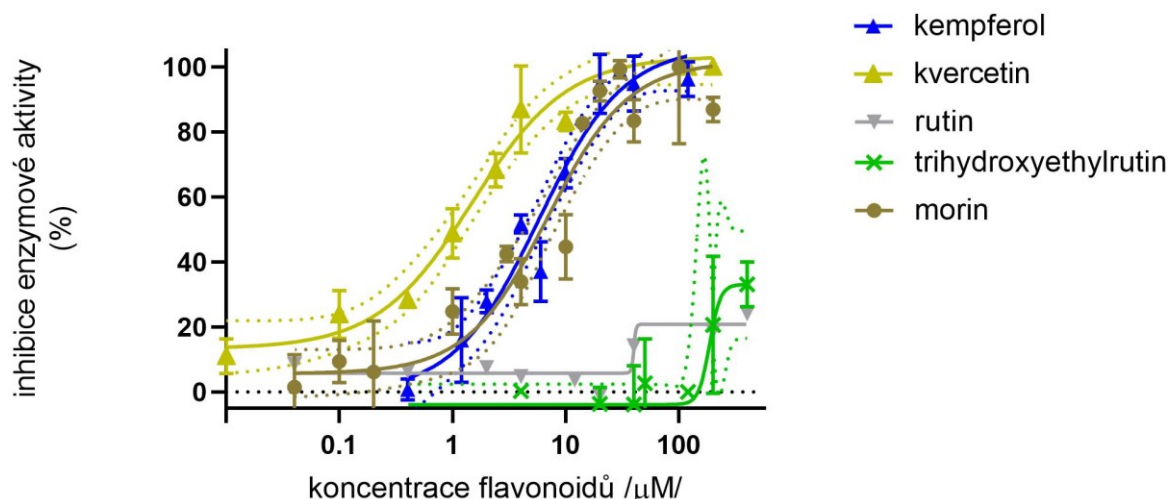
Obrázek č. 33: Grafické znázornění závislosti inhibiční aktivity luteolinu, chrysinu a diosminu na jejich koncentraci s použitím 95% konfidenčních intervalů

Z Obr. č. 33 je patrné, že luteolin disponuje dobrou inhibiční aktivitou. Křivka jeho inhibice spolu s 95% konfidenčním intervalem poměrně strmě stoupá a v koncentraci 100  $\mu\text{M}$  dosahuje v podstatě 100 %. Oproti tomu flavony chrysin a diosmin vysokou inhibiční aktivitu nevykazují. Diosmin, lišící se od luteolinu methylací hydroxyskupiny na C4' a glykosidovou strukturou, začíná projevovat inhibiční aktivitu až v koncentraci přibližně 100  $\mu\text{M}$ , přičemž jeho aktivita se ve vyšších zkoumaných koncentracích neukazuje být dostatečná. To platí také o chrysinu, který ani ve vysoké koncentraci nevykazuje slibnou aktivitu. Oproti luteolinu postrádá tato látka hydroxylové skupiny na kruhu B.



Obrázek č. 34: Grafické znázornění závislosti inhibiční aktivity flavonu, 3-hydroxyflavonu, 5-hydroxyflavonu, 7-hydroxyflavonu a 7,8-dihydroxyflavonu na jejich koncentraci s použitím 95% konfidenčních intervalů

Při porovnání účinků jednotlivých flavonoidů na Obr. č. 34 je zřejmý rozdíl v inhibiční aktivitě mezi disubstituovaným 7,8-dihydroxyflavonem a ostatními hydroxyflavony. Křivka 7,8-dihydroxyflavonu plynule roste od koncentrace menší než 1  $\mu\text{M}$  a v koncentraci 200  $\mu\text{M}$  dosahuje již více než 80 % inhibice enzymové aktivity. Monosubstituované flavony mají inhibiční aktivitu nižší. Jako nejvíce aktivní z nich se zdá být 3-hydroxyflavon, následovaný 5-hydroxyflavonem a 7-hydroxyflavonem. Všechny tři látky mají v koncentracích od přibližně 30  $\mu\text{M}$  prolínající se 95% konfidenční intervaly. Konfidenční interval 3-hydroxyflavonu se navíc až do koncentrace přibližně 40  $\mu\text{M}$  prolíná s konfidenčním intervalem 7,8-dihydroxyflavonu. Flavon, neobsahující žádnou hydroxylovou skupinu, nevykazuje vůči  $\alpha$ -glukosidase aktivitu téměř žádnou.



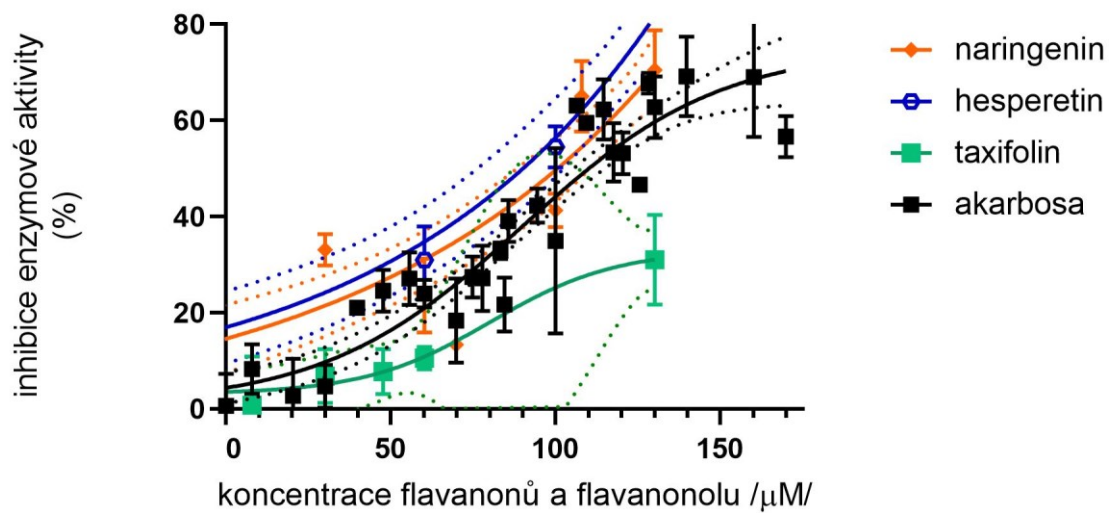
Obrázek č. 35: Grafické znázornění závislosti inhibiční aktivity kempferolu, kvercetin, rutinu, trihydroxyethylrutinu a morinu na jejich koncentraci s použitím 95% konfidenčních intervalů

Poslední graf (Obr. č. 35) zobrazuje tři nejvíce inhibičně účinné látky. Nejvyšší inhibiční aktivitu má kvercetin s pěti hydroxylovými skupinami v polohách C3, C5, C7, C3' a C4'. Je aktivní již ve velmi nízkých koncentracích a v koncentraci 10 μM dosahuje již téměř 100% inhibiční aktivity. Inhibiční křivky kempferolu a morinu jsou téměř shodné a jejich konfidenční intervaly se v celé délce prolínají. Jejich molekuly se liší pouze v poloze C2', kde má morin oproti kempferolu jednu hydroxylovou skupinu navíc. Křivky obou látek začínají před koncentrací 1 μM prudce stoupat a v koncentraci přibližně 100 μM již dosahuje jejich inhibice enzymové aktivity 100 %. Tyto křivky jsou strmější než křivka kvercetin, ovšem ten je aktivní již v nižších koncentracích. Konfidenční intervaly těchto tří látek se v přibližně 20 μM koncentraci začínají prolínat. Dalšími dvěma látkami zobrazenými v grafu jsou glykosidy rutin a troxerutin. Rutin je odvozený od kvercetin glykosylací skrze hydroxyskupinu v poloze C3. Tento flavonol vykazuje ve vyšších koncentracích stále velmi nízké hodnoty inhibiční aktivity. Inhibiční aktivita trihydroxyethylrutinu, který oproti rutinu obsahuje trihydroxyethylové zbytky v polohách C7, C3' a C4', v koncentracích vyšších než 100 μM strmě narůstá. Jeho hodnoty inhibiční aktivity jsou také nízké.

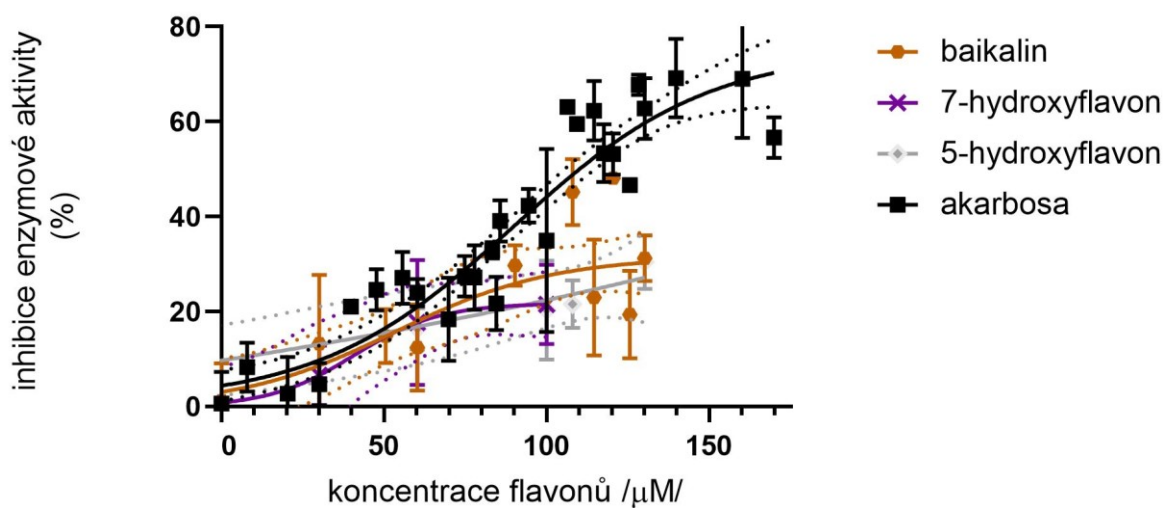
#### 6.4 Grafické porovnání inhibiční aktivity vybraných flavonoidů a akarbosy při použití 95% konfidenčních intervalů

Následující grafy (Obr. č. 36-39) zobrazují inhibiční křivky dvanácti vybraných nejlépe účinných flavonoidů a akarbosy, které jsou opatřeny 95% konfidenčními intervaly pro

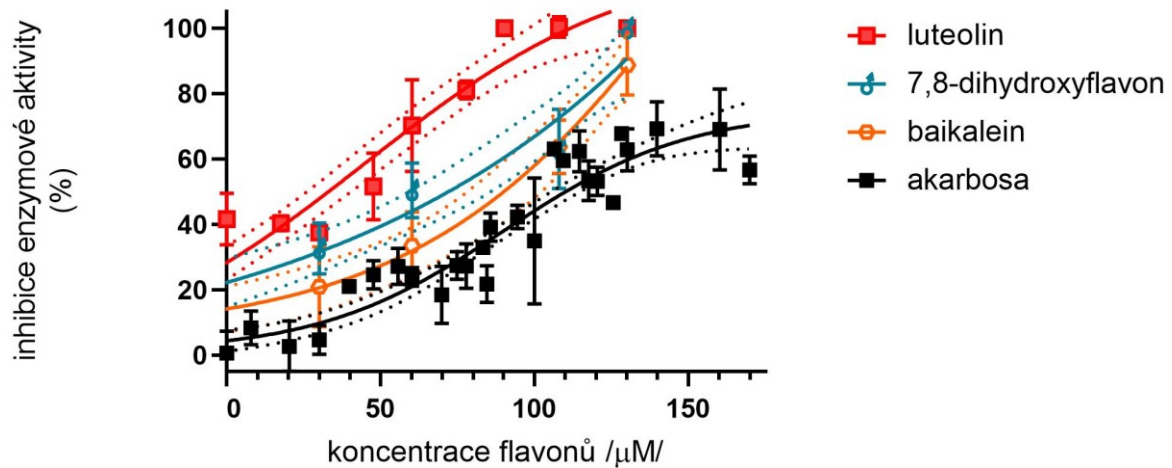
důkladnější porovnání účinku. Grafy méně účinných flavonoidů s konfidenčními intervaly se pro přehlednost nevedly.



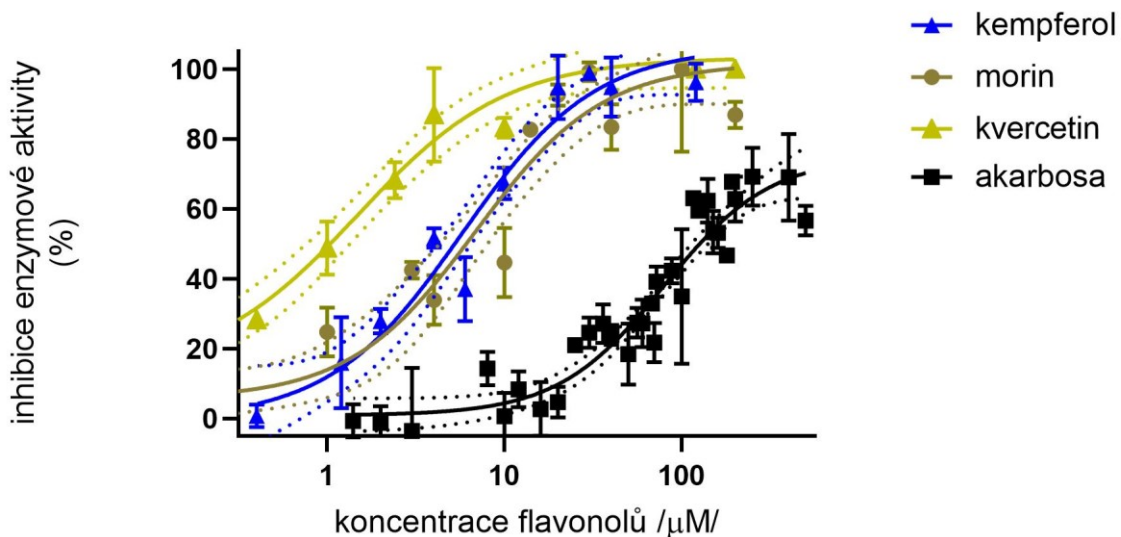
Obrázek č. 36: Srovnání inhibiční účinnosti hesperetinu, naringeninu a taxifolinu s akarbosou při použití 95% konfidenčních intervalů



Obrázek č. 37: Srovnání inhibiční účinnosti baikalinu, 7-hydroxyflavonu a 5-hydroxyflavonu s akarbosou při použití 95% konfidenčních intervalů



Obrázek č. 38: Srovnání inhibiční účinnosti luteolinu, 7,8-dihydroxyflavonu a baikaleinu s akarbosou při použití 95% konfidenčních intervalů



Obrázek č. 39: Srovnání inhibiční účinnosti kempferolu, morinu a kvercetinu s akarbosou při použití 95% konfidenčních intervalů

Z grafů je zřejmé, že inhibiční aktivitou vyšší než akarbosa disponuje pouze 6 testovaných látek. Nejlepší účinek má kvercetin, následovaný kempferolem a morinem (Obr. č. 39). V měřených koncentracích se jejich konfidenční intervaly vůbec nesečínají a poukazují na schopnost těchto flavonoidů účinkovat na rozdíl od akarbosy již ve velmi nízkých koncentracích.

Čtvrtým neúčinnějším flavonoidem je luteolin, jehož konfidenční interval je v měřených koncentracích stále dosti vzdálený od akarbosy (Obr. č. 38). O trochu nižší účinek

vykazuje 7,8-dihydroxyflavon, jehož konfidenční interval je v měřených koncentracích zobrazený v průměru asi o 10 % výš než konfidenční interval akarbosy (Obr. č. 38).

Posledním flavonoidem, jehož inhibiční křivka převyšuje křivku akarbosy, je hesperetin. Jeho spodní hranice konfidenčního intervalu se téměř potkává s horní hranicí konfidenčního intervalu akarbosy (Obr. č. 36). Účinek tohoto flavonoidu tak mírně účinek akarbosy přesahuje.

Baikalein (Obr. č. 38) a naringenin (Obr. č. 36) mají křivku inhibiční aktivity výš než akarbosa, ovšem jejich hranice konfidenčních intervalů se ve velkém rozmezí koncentrací prolínají s konfidenčním intervalem akarbosy, což znamená, že je jejich účinek srovnatelný. Taxifolin (Obr. č. 36), baikalin, 7-hydroxyflavon a 5-hydroxyflavon (Obr. č. 37) mají v nižších koncentracích aktivitu s akarbosou téměř shodnou, postupně se ovšem jejich nárůst inhibiční aktivity zpomaluje a křivky se od konfidenčního intervalu akarbosy vzdalují.



## 7. DISKUZE

$\alpha$ -glukosidasa je podjednotkou enzymového komplexu s názvem maltasa-glukoamylasa (MGAM) a je jedním z šesti klíčových enzymů, které umožňují rozklad sacharidové složky potravy na jednotlivé do krve vstřebatelné monomery.  $\alpha$ -glukosidasa hydrolyticky štěpí převážně terminální, neredukující  $\alpha$ -(1,4) vázané zbytky  $\alpha$ -D-glukosy s uvolněním D-glukosy. Její fyziologická funkce umožňuje rychlý vznik jednotlivých glukosových monomerů, které se následně vstřebávají srze střešní stěnu do krve. V důsledku toho se v krvi náhle zvyšuje glykemie, na což organismus reaguje zvýšenou produkcí insulínu. (23,24,96)

Rychlý nárůst postprandiální glykemie ohrožuje pacienty trpící diabetickým onemocněním. (96) Z toho důvodu byla vyvinuta antidiabetická léčiva inhibující účinek  $\alpha$ -glukosidasy, která zamezují přílišnému nárůstu postprandiální glykemie a snižují tak zátěž na  $\beta$ -buňky slinivky břišní diabetických pacientů. (2) Celkem se ve světě používají tři inhibitory  $\alpha$ -glukosidas (96), ovšem u nás je registrovaná pouze akarbose. Ta není u pacientů příliš v oblibě kvůli jejím nežádoucím účinkům zahrnujícím různé druhy gastrointestinálních potíží. (2)

Jistý inhibiční účinek na  $\alpha$ -glukosidasu byl zpozorován u flavonoidů. Tyto přírodní polyfenolické látky, vyskytující se v mnoha našich přirozených složkách stravy (ovoce, zelenina, ořechy, obiloviny, čaj) (25,26), jsou již od pradávna také nedílnou součástí přípravků tradiční čínské medicíny a jejich účinky na naše zdraví se čím dál více zabývají vědecké práce z celého světa. (97) Flavonoidy jsou v podstatě netoxické látky a některé jsou již delší dobu součástí doplňků stravy či registrovaných léčivých přípravků.

Jedním z těchto léčiv je také tradiční rostlinný léčivý přípravek Diabetan®. Tato čajová směs obsahuje rostlinné drogy (*Phaseoli fructus sine semen*, *Myrtilli herba*, *Salviae herba*, *Galegae herba*, *Polygoni avicularis herba*, *Taraxaci radix cum herba*, *Rubi fruticosi folium*, *Foeniculi amari fructus*, *Bardanae radix*, *Liquiritiae radix*), jejichž účinné látky „vykazují různorodé mechanismy účinků v preklinických i klinických studiích – zvyšují inzulínovou sekreci, snižují inzulínovou rezistenci, chrání pankreatické  $\beta$ -buňky, snižují hmotnost, upravují lipidový profil, pozitivně ovlivňují metabolismus tukové tkáně, inhibují  $\alpha$ -glukosidasu, působí

*jako antioxidanty a snižují riziko rozvoje pozdních komplikací diabetu*".<sup>(98)</sup> Jelikož jsou flavonoidy ve vyšší míře obsaženy v 7 z 10 složek tohoto léčivého čaje, má hledání nových potenciálních inhibitorů  $\alpha$ -glukosidas přírodního původu ve skupině flavonoidů své opodstatnění.

Tato práce se zabývá výzkumem dvaceti dvou vybraných flavonoidů s potenciálem inhibovat  $\alpha$ -glukosidasu. Výsledky spektrofotometrického stanovení inhibiční účinnosti jednotlivých flavonoidů ukázaly, že pouze šest z nich dosáhlo účinku lepšího než standardní léčivo akarbosa. Tyto flavonoidy jsou kvercetin, kempferol, morin, luteolin, 7,8-dihydroxyflavon a hesperetin (Obr. č. 36, 38, 39).

Nejúčinnější z testovaných látek, kvercetin, inhiboval  $\alpha$ -glukosidasu již ve velmi nízkých koncentracích (Obr. č. 35, 39). Jeho inhibice dosáhla přibližně 10 % v koncentraci okolo 0,01  $\mu$ M a v přibližně 10 $\mu$ M koncentraci už jeho inhibiční účinek dosáhl téměř 90 %. Druhý nejúčinnější flavonoid byl kempferol, jehož účinnost se téměř shodovala s třetím nejúčinnějším morinem (Obr. č. 35, 39). Obě tyto látky sice dosahovaly 100% inhibice enzymové aktivity už v koncentraci přibližně 100  $\mu$ M, oproti kvercetinu ovšem inhibovaly  $\alpha$ -glukosidasu z 10 % až v koncentraci okolo 1  $\mu$ M.

Čtvrtým nejúčinnějším flavonoidem byl luteolin. Jeho inhibiční aktivita, podobně jako u kempferolu a morinu, dosáhla 100 % v koncentraci 100  $\mu$ M (Obr. č. 33, 38). Oproti výše zmíněným látkám ovšem účinek nastoupil až v koncentraci přibližně 5  $\mu$ M. O trochu nižší účinek vykázal 7,8-dihydroxyflavon, jehož inhibiční aktivita dosahovala v koncentraci 100  $\mu$ M pouze 80 % (Obr. č. 34, 38). Posledním z šesti nejúčinnějších flavonoidů byl hesperetin, který svými naměřenými hodnotami jen mírně převyšoval účinek akarbosy (Obr. č. 29, 36).

Mírný účinek, v jistých koncentracích srovnatelný s akarbosou, mělo sedm látek – naringenin, 3-hydroxyflavon, 5-hydroxyflavon, 7-hydroxyflavon, taxifolin, baikalin a baikalein (Obr. č. 34,36-38). Zbýlých devět látek (naringin, hesperidin, chrysin, flavon, diosmin, rutin, trihydroxyethylrutin, epikatechin a katechin) významný inhibiční účinek neprokázalo (Obr. č. 29-31,33-35).

Po porovnání vztahu mezi strukturou flavonoidů a mírou jejich inhibičního účinku lze vyvodit vliv jednotlivých klíčových strukturních aspektů na inhibici  $\alpha$ -glukosidasy.

Z naměřených inhibičních hodnot testovaných flavonoidů vyplývá, že glykosidová struktura, navázaná v polohách C3 a C7 (Obr. č. 6, 8, 19, 27), významně snižuje inhibiční účinek původního aglykonu (Obr. č. 29, 30, 32, 35). Tento pokles může být způsobený potřebou neobsazených hydroxylových skupin v poloze C3 a C7 pro vznik vazby s enzymem či sterickým bráněním vazby flavonoidu do malého aktivního místa enzymu velkou molekulou glykosidu.

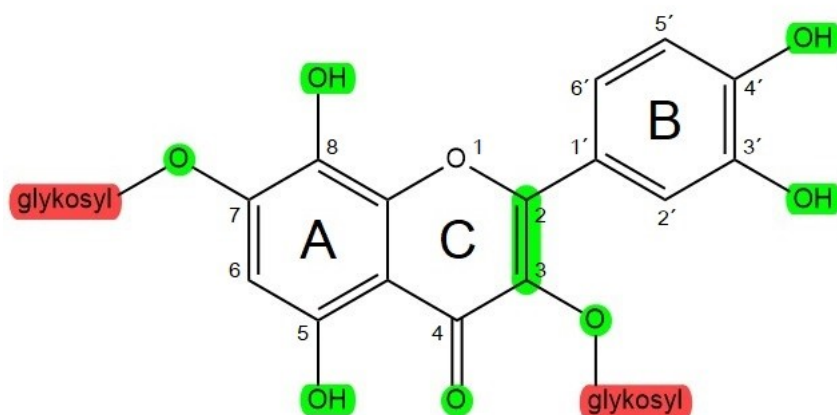
Z hlediska hledání pozitivního vlivu substituce na jednotlivých uhlících je patrné, že hydroxylová substituce zpravidla zvyšuje inhibiční aktivitu flavonoidů, což dokazuje porovnání účinku flavonu, 3-hydroxyflavonu, 5-hydroxyflavonu, 7-hydroxyflavonu a 7,8-dihydroxyflavonu na Obrázku č. 34. Na kruhu A se změnou polohy hydroxylové skupiny aktivita flavonoidů mění. U všech flavonoidů s inhibičním účinkem větším než má akarboza se hydroxylová skupina v molekule vyskytuje v poloze C7 (Obr. č. 7, 17, 20, 24, 25, 26). Ta se zdá mít na účinek silný vliv, jelikož po navázání glykosylové struktury na její kyslík (viz výše) ztrácí molekula velkou část své inhibiční aktivity. Další významná hydroxylová substituce se zdá být ta v poloze C5. Zde má hydroxylovou skupinu navázanou pět ze šesti nejvíce účinných testovaných látek (Obr. č. 7, 20, 24, 25, 26). Inhibiční potenciál nejspíš má i hydroxylová substituce na uhlíku C8, což je patrné z rozdílu aktivit 7-hydroxyflavonu a 7,8-dihydroxyflavonu na Obrázku č. 34. Vliv má samozřejmě také počet hydroxylů.

Z výsledků míry inhibice  $\alpha$ -glukosidasy lze usoudit, že významnou roli hraje přítomnost hydroxylových skupin na kruhu B. Při porovnání struktury (Obr. č. 20,22) a účinku (Obr. č. 33) luteolinu a diosminu je patrná velká výhoda této hydroxylové substituce. Rozdíl v účinku mezi kvercetinem (Obr. č. 24) a kempferolem (Obr. č. 25) s morinem (Obr. č. 26) na Obrázku č. 39 ukazuje nejen pozitivní účinek hydroxylovaného kruhu B na inhibiční aktivitu flavonoidů, ale ukazuje také nejvhodnější uspořádání jednotlivých substituentů. Zdá se, že hydroxylace v polohách C3' a C4' u kvercetinu je vhodnější než v polohách C2' a C4' u kempferolu nebo než samotná hydroxylace v poloze C4' u morinu.

Vliv na účinek flavonoidů má také kruh C. Při porovnání míry účinku luteolinu (Obr. č. 20) a kvercetinu (Obr. č. 24) na Obrázcích č. 38 a 39 je patrné, že 3-hydroxy substituce zvyšuje  $\alpha$ -glukosidasový potenciál flavonoidů. Dalším strukturálním prvkem B kruhu, který mění inhibiční aktivitu flavonoidů, je nenasycená dvojná vazba mezi uhlíky C2 a C3. Rozdíl

v aktivitách je zřejmý při porovnání účinku flavonolu kvercetin (Obr. č. 24) a flavanonolu taxifolinu (Obr. č. 13) na Obrázcích č. 36 a 39. Ještě větší rozdíl v inhibičních aktivitách můžeme najít mezi kvercetinem (Obr. č. 39) a katechinem s epikatechinem (Obr. č. 31). Na rozdíl od velmi účinného kvercetinu je inhibiční aktivita katechinu a epikatechinu nedostatečná. Tento velký rozdíl je pravděpodobně způsobený rozdíly na kruhu C. Nejen, že epikatechin a katechin postrádají dříve zmíněnou dvojnou vazbu mezi uhlíky C2 a C3, ale navíc ještě postrádají ketoskupinu v poloze C4 (Obr. 10,11), která se tudíž jeví jako další důležitý strukturální prvek flavonoidů při inhibici  $\alpha$ -glukosidasy.

Jednotlivé strukturální prvky mající vliv na inhibiční účinek vůči  $\alpha$ -glukosidase jsou zaznačeny v následujícím Obrázku č. 40.



Obrázek č. 40: Vyznačení důležitých strukturálních prvků na molekule flavonoidu (zelená barva značí inhibičně výhodné substituce, červená barva značí substituce nevýhodné)

Tyto strukturální závislosti podporují i některé zahraniční práce. <sup>(96, 99, 100)</sup> Proença, C., M. Freitas, D. Ribeiro, et al. ve své práci vztah struktury a účinku hodnotí za užití testů *in vitro* a *in silico*. Jejich práce považuje hydroxylace v polohách C3, C5, C7, C8, C3' a C4' za nezbytné pro vysoký inhibiční účinek flavonoidů. Mezi další nepostradatelné strukturální prvky podle nich patří dvojná vazba mezi C2 a C3. Tyto závěry se shodují s výsledky této práce. Jelikož všechny testované flavonoidy v zahraniční práci obsahují ketoskupinu v poloze 4, dá se vyvodit, že i tuto skupinu považují za významnou pro účinek, což se opět shoduje s výsledky této práce. Söhretoğlu, D. a S. Sari ve své rešeršní práci hodnotí dvojnou vazbu mezi C2 a C3 a volnou hydroxylovou skupinu v poloze C4' na kruhu B jako klíčové prvky pro

vysokou inhibiční aktivitu flavonoidů. Dále poukazuje na kladný vliv hydroxylace v jakékoli pozici, zejména ale na uhlících C3 a C5. Zároveň přisuzuje glykosylaci těchto skupin negativní vliv, stejně jako methylaci hydroxylů v polohách C5 a C7. Jelikož se tato práce zabývá opět pouze látkami s ketoskupinou v poloze C4, lze usuzovat, že je její přítomnost pro inhibiční účinek klíčová. Rešeršní práce tedy souhlasí s výsledky, které jsou uvedeny v této diplomové práci. I další rešeršní práce sepsaná autory Xiao, J., G. Kai, K. Yamamoto, et al. podporuje výsledky této práce. Rešerše hodnotí jako klíčové prvky dvojnou vazbu mezi C2 a C3, ketoskupinu v poloze C4 a hydroxyskupiny v polohách C3, C5, C7 a C4'. Poukazuje také na to, že pokud dojde k hydrogenaci zmíněné dvojně vazby nebo ke glykosylaci hydroxylů v polohách C3 a C7, dojde ke snížení aktivity výsledného flavonoidu. Účinek zvyšující inhibiční aktivitu mají dle této rešeršní práce hydroxylové substituce obecně, zejména ale v polohách C6, C3' a C5'.

Díky své dobré inhibiční aktivitě na  $\alpha$ -glukosidasu můžeme flavonoidy považovat za látky, které by se daly využít při léčbě pacientů s onemocněním diabetes mellitus. Jejich spektrum účinku zahrnuje i antioxidační účinky, které v lidském těle umožňují flavonoidům působit kardioprotektivně a antiatheroskleroticky <sup>(39,46,49,60,76)</sup>, což je u diabetiků žádoucí. Používat by se mohly jako doplňky stravy nebo doplňková léčba upravující vstřebávání glukosy do těla. Z inhibičního potenciálu flavonoidů by mohli těžit i pacienti s prediabetem či lidé s predispozičními faktory pro vznik diabetu.

## 8. ZÁVĚR

Tato diplomová práce dokazuje inhibiční účinek flavonoidů na enzym  $\alpha$ -glukosidasu. Bylo zjištěno, že šest z celkově dvaceti dvou testovaných flavonoidů disponuje vyšší inhibiční aktivitou, než běžně užívané léčivo akarbose, které bylo zvoleno jako standard. Tyto flavonoidy jsou kvercetin, kempferol, morin, luteolin, 7,8-dihydroxyflavon a hesperetin. Na rozdíl od akarbose, která projevovala inhibiční účinek na enzym až ve vyšších koncentracích, flavonoidy prokázaly inhibiční aktivitu již v koncentracích nižších.

Součástí této diplomové práce byla také analýza vlivu strukturních aspektů flavonoidů na výši inhibiční aktivity. Při porovnání tohoto vztahu bylo zjištěno, že substituce hydroxylovými skupinami obecně zvyšuje inhibiční potenciál flavonoidů. Největší pozitivní vliv má hydroxylace v polohách C3, C5, C7, C8, C3' a C4'. Inhibiční potenciál také zvyšují ketoskupina na uhlíku C4 a nenasycená dvojná vazba mezi uhlíky C2 a C3. Naopak negativní vliv na účinek flavonoidů má glykosylace.

Závěrem lze říci, že flavonoidy se jeví jako vhodné v potravě přirozeně se vyskytující inhibitory  $\alpha$ -glukosidasy. Pro podporu těchto výsledků je ovšem za potřebí dalších testů *in vitro* na savčí  $\alpha$ -glukosidase.

## 9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. KAREN, I. a Š. SVAČINA. Diabetes mellitus a komorbidity: doporučený diagnostický a terapeutický postup pro všeobecné praktické lékaře. Druhé, aktualizované vydání. Praha: Centrum doporučených postupů pro praktické lékaře, Společnost všeobecného lékařství. 2021. Doporučené postupy pro všeobecné praktické lékaře. ISBN 978-80-88280-26-2.
2. SOUHRN ÚDAJŮ O PŘÍPRAVKU: AKARBOSA MYLAN. Praha: Státní úřad pro kontrolu léčiv. [cit. 2022-11-28]
3. International Diabetes Federation: Diabetes facts & figures [online]. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation. 2023. [cit. 2023-03-05]
4. Search query: natural alpha glucosidase inhibitors. Pubmed [online]. National Library of Medicine. [cit. 2023-03-03]
5. RAČICKÁ, E. Metformin: stará látka – nové indikace. KLINICKÁ FARMAKOLOGIE A FARMACIE. 2018, 32(1), 27–30. ISSN 1212-7973.
6. BARBER, E., M. J. HOUGHTON a G. WILLIAMSON. Flavonoids as Human Intestinal  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitors. Foods. 2021, 10(8). ISSN 2304-8158.
7. THAO, N. P., P. T. BINH, N. T. LUYEN, et al. A -Amylase and  $\alpha$  -Glucosidase Inhibitory Activities of Chemical Constituents from Wedelia chinensis (Osbeck.) Merr. Leaves. Journal of Analytical Methods in Chemistry. 2018, 2018, 1-8. ISSN 2090-8865.
8. XIONG, Y., K. NG, P. ZHANG, et al. In Vitro  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -Amylase Inhibitory Activities of Free and Bound Phenolic Extracts from the Bran and Kernel Fractions of Five Sorghum Grain Genotypes. Foods. 2020, 9(9). ISSN 2304-8158.
9. RYBKA, J. Diabetes mellitus - komplikace a přidružená onemocnění: diagnostické a léčebné postupy. Praha: Grada. 2007. ISBN 978-80-247-1671-8.
10. VONDRÁČKOVÁ, H.. Vztah mezi stavem kompenzace a renálními funkcemi u pacientů s diabetes mellitus II. typu. Hradec Králové. 2021. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra biochemických věd. Vedoucí práce Szotáková, Barbora.
11. Zhruba milion Čechů trpí cukrovkou a nemocných neustále přibývá [online]. Praha: Státní zdravotní ústav. 2021. [cit. 2022-11-27]
12. MAZÁNKOVÁ, A. Farmaceutická péče u diabetických pacientů v oblasti podiatrie. Hradec Králové. 2022. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra sociální a klinické farmacie. Vedoucí práce Kolmanová, Eliška.
13. Doporučení pro diagnostiku a léčbu DM 2. typu podle guidelines American Diabetes Association a České diabetologické společnosti. ProLékaře.cz [online]. Praha: MeDitorial. 2016. [cit. 2022-11-27]
14. KAREN, I. a Š. SVAČINA. Diabetes mellitus: doporučené diagnostické a terapeutické postupy pro všeobecné praktické lékaře 2020. Druhé, aktualizované vydání. Praha: Centrum doporučených postupů pro praktické lékaře, Společnost všeobecného lékařství. 2020. Doporučené postupy pro praktické lékaře. ISBN 978-80-88280-16-3.

15. LAUBE, H. Acarbose. *Clinical Drug Investigation*. 2002, 22(3), 141-156. ISSN 1173-2563.
16. BORGES DE MELO, E., A. DA SILVEIRA GOMES a I. CARVALHO. A- and  $\beta$ -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. *Tetrahedron*. 2006, 62(44), 10277-10302. ISSN 00404020.
17. EGG BRITE: Enzymes [online]. Kanehisa Laboratories. 2023. [cit. 2023-01-27]
18. JIANG, J. a S. GHOSH. Glucosidase. RCSB Protein Data Bank. ISSN 1234-432X.
19. KIMURA, A., J.-H. LEE, I.-S. LEE, et al. Two potent competitive inhibitors discriminating  $\alpha$ -glucosidase family I from family II. *Carbohydrate Research*. 2004, 339(6), 1035-1040. ISSN 00086215.
20. ROIG-ZAMBONI, V., B. COBUCCI-PONZANO, R. IACONO, et al. Structure of human lysosomal acid  $\alpha$ -glucosidase—a guide for the treatment of Pompe disease. *Nature Communications*. 2017, 8(1). ISSN 2041-1723.
21. ARUMAPPERUMA, T., J. LI, B. HORNING, et al. A subfamily classification to choreograph the diverse activities within Glycoside Hydrolase family 31 (GH31). *Journal of Biological Chemistry*. 2023. ISSN 00219258.
22. SIM, L., R. QUEZADA-CALVILLO, E. E. STERCHI, et al. Human Intestinal Maltase—Glucoamylase: Crystal Structure of the N-Terminal Catalytic Subunit and Basis of Inhibition and Substrate Specificity. *Journal of Molecular Biology*. 2008, 375(3), 782-792. ISSN 00222836.
23. LIN, A. H.-M., B.-H. LEE a W.-J. CHANG. Small intestine mucosal  $\alpha$ -glucosidase: A missing feature of in vitro starch digestibility. *Food Hydrocolloids*. 2016, 53, 163-171. ISSN 0268005X.
24. DIAZ-SOTOMAYOR, M., R. QUEZADA-CALVILLO, S. E. AVERY, et al. Maltase-Glucoamylase Modulates Gluconeogenesis and Sucrase-Isomaltase Dominates Starch Digestion Glucogenesis. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition*. 2013, 57(6), 704-712. ISSN 0277-2116.
25. SPILKOVÁ, J. *Farmakognozie*. Praha: Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum. 2016. ISBN 978-80-246-3264-3.
26. ŘÍHOVÁ, H. *Flavonoidy - stručný přehled a biologický význam*. 2008. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra biochemických věd. Vedoucí práce Kvasničková, Eva.
27. BOŠTÍKOVÁ, Z. *Vliv dihydromyricetinu a myricetinu na vybrané biotransformační enzymy*. Praha. 2017. Rigorózní práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie.
28. PANCHE, A. N., A. D. DIWAN a S. R. CHANDRA. Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*. 2016, 5. ISSN 2048-6790.
29. WOLF, K. *Flavonoidy jako deaktivátory lipidové peroxidace*. Praktický lékař. Praha: Česká lékařská společnost J. E. Purkyně. 2002, (8), 446-450. ISSN 1805-4544.



30. NAJMANOVÁ, I., M. VOPRŠALOVÁ, L. SASO, et al. The pharmacokinetics of flavanones. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2020, 60(18), 3155-3171. ISSN 1040-8398.
31. SALEHI, B., P. FOKOU, M. SHARIFI-RAD, et al. The Therapeutic Potential of Naringenin: A Review of Clinical Trials. *Pharmaceuticals*. 2019, 12(1). ISSN 1424-8247.
32. Venkateswara R. P., S. D. V. S. Kiran, Rohini P. et al. Flavonoid: A review on Naringenin. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2017, 6(5), 2778-2783. ISSN 2278-4136.
33. YANG, Y., M. TREVETHAN, S. WANG, et al. Beneficial effects of citrus flavanones naringin and naringenin and their food sources on lipid metabolism: An update on bioavailability, pharmacokinetics, and mechanisms. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2022, 104. ISSN 09552863.
34. CHEN, R., Q.-L. QI, M.-T. WANG, et al. Therapeutic potential of naringin: an overview. *Pharmaceutical Biology*. 2016, 54(12), 3203-3210. ISSN 1388-0209.
35. WADOWIAK, K., J. WALKOWIAK, R. PIETRZAK, et al. Bioavailability of Hesperidin and Its Aglycone Hesperetin—Compounds Found in Citrus Fruits as a Parameter Conditioning the Pro-Health Potential (Neuroprotective and Antidiabetic Activity)—Mini-Review. *Nutrients*. 2022, 14(13). ISSN 2072-6643.
36. PARHIZ, H., A. ROOHBAKHSH, F. SOLTANI, et al. Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of the Citrus Flavonoids Hesperidin and Hesperetin: An Updated Review of their Molecular Mechanisms and Experimental Models. *Phytotherapy Research*. 2015, 29(3), 323-331. ISSN 0951418X.
37. ROOHBAKHSH, A., H. PARHIZ, F. SOLTANI, et al. Molecular mechanisms behind the biological effects of hesperidin and hesperetin for the prevention of cancer and cardiovascular diseases. *Life Sciences*. 2015, 124, 64-74. ISSN 00243205.
38. MARTÍN, M. Á. a S. RAMOS. Impact of Dietary Flavanols on Microbiota, Immunity and Inflammation in Metabolic Diseases. *Nutrients*. 2021, 13(3). ISSN 2072-6643.
39. AL-DASHTI, Y. A., R. R. HOLT, C. L. STEBBINS, et al. Dietary Flavanols: A Review of Select Effects on Vascular Function, Blood Pressure, and Exercise Performance. *Journal of the American College of Nutrition*. 2018, 37(7), 553-567. ISSN 0731-5724.
40. (+)-catechin [online]. WIKIDATA. 2023. [cit. 2023-01-03]
41. COȘARCĂ, S., C. TANASE a D. L. MUNTEAN. Therapeutic Aspects of Catechin and Its Derivatives – An Update. *Acta Biologica Marisiensis*. 2019, 2(1), 21-29. ISSN 2668-5124.
42. QU, Z., A. LIU, P. LI, et al. Advances in physiological functions and mechanisms of (–)-epicatechin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2021, 61(2), 211-233. ISSN 1040-8398.
43. PRAKASH, M., B.V. BASAVARAJ a K.N. CHIDAMBARA MURTHY. Biological functions of epicatechin: Plant cell to human cell health. *Journal of Functional Foods*. 2019, 52, 14-24. ISSN 17564646.

44. KUMAR, M., A. DAHUJA, S. TIWARI, et al. Recent trends in extraction of plant bioactives using green technologies: A review. *Food Chemistry*. 2021, 353. ISSN 03088146.
45. MISHRA, P. K. Nano-engineered flavonoids for cancer protection. *Frontiers in Bioscience*. 2019, 24(6), 1097-1157. ISSN 10939946.
46. DAS, A., R. BAIDYA, T. CHAKRABORTY, et al. Pharmacological basis and new insights of taxifolin: A comprehensive review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021, 142. ISSN 07533322.
47. SAFTAR ASMI, K., T. LAKSHMI, S. RENUKADEVI BALUSAMY, et al. Therapeutic aspects of taxifolin – An update. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research*. 2017, 7(3), 187-189. ISSN 2249-3379.
48. KU, Y.-S., M.-S. NG, S.-S. CHENG, et al. Understanding the Composition, Biosynthesis, Accumulation and Transport of Flavonoids in Crops for the Promotion of Crops as Healthy Sources of Flavonoids for Human Consumption. *Nutrients*. 2020, 12(6). ISSN 2072-6643.
49. SINGH, M., M. KAUR a O. SILAKARI. Flavones: An important scaffold for medicinal chemistry. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2014, 84, 206-239. ISSN 02235234.
50. HOSTETLER, G. L., R. A. RALSTON a S. J. SCHWARTZ. Flavones: Food Sources, Bioavailability, Metabolism, and Bioactivity. *Advances in Nutrition*. 2017, 8(3), 423-435. ISSN 21618313.
51. RUTZ, A., M. SOROKINA, J. GALGONEK, et al. The LOTUS initiative for open knowledge management in natural products research. *ELife*. 2022, 11. ISSN 2050-084X.
52. CHEN, Y.-C., S.-C. SHEN, J.-M. CHOW, et al. Flavone inhibition of tumor growth via apoptosis in vitro and in vivo. *International Journal of Oncology*. 2004. ISSN 1019-6439.
53. CARUSO, Í. P., J. M. B. FILHO, A. S. DE ARAÚJO, et al. An integrated approach with experimental and computational tools outlining the cooperative binding between 2-phenylchromone and human serum albumin. *Food Chemistry*. 2016, 196, 935-942. ISSN 03088146.
54. NAJMUS-SAQIB, Q., F. ALAM a M. AHMAD. Antimicrobial and cytotoxicity activities of the medicinal plant *Primula macrophylla*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2009, 24(3), 697-701. ISSN 1475-6366.
55. PubChem Compound Summary for CID 68112, 5-Hydroxyflavone [online]. National Center for Biotechnology Information. 2023. [cit. 2023-01-03]
56. UIVAROSI, V., M. BADEA, R. OLAR, et al. Synthesis and Characterization of Some New Complexes of Magnesium (II) and Zinc (II) with the Natural Flavonoid Primuletin. *Molecules*. 2013, 18(7), 7631-7645. ISSN 1420-3049.
57. CALDERONE, V., S. CHERICONI, C. MARTINELLI, et al. Vasorelaxing effects of flavonoids: investigation on the possible involvement of potassium channels.

- Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. 2004, 370(4), 290-298. ISSN 0028-1298.
58. 7-hydroxyflavone [online]. WIKIDATA. 2023. [cit. 2023-01-02]
  59. ZHANG, Q., Y. PENG, J. LIU, et al. 7-Hydroxyflavone Alleviates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Rats by Regulating Inflammation. *Molecules*. 2022, 27(17). ISSN 1420-3049.
  60. BUTUN, B., G. TOPCU a T. OZTURK. Recent Advances on 3-Hydroxyflavone Derivatives: Structures and Properties. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2018, 18(2). ISSN 13895575.
  61. WANG, J., H. SU, T. ZHANG, et al. Inhibition of Enterovirus 71 Replication by 7-Hydroxyflavone and Diisopropyl-Flavon7-yl Phosphate. *PLoS ONE*. 2014, 9(3). ISSN 1932-6203.
  62. PAUL, R., J. NATH, S. PAUL, et al. Suggesting 7,8-dihydroxyflavone as a promising nutraceutical against CNS disorders. *Neurochemistry International*. 2021, 148. ISSN 01970186.
  63. PubChem Compound Summary for CID 1880, 7,8-Dihydroxyflavone [online]. National Center for Biotechnology Information, 2023. [cit. 2023-01-04]
  64. WANG, Z., S.-P. WANG, Q. SHAO, et al. Brain-derived neurotrophic factor mimetic, 7,8-dihydroxyflavone, protects against myocardial ischemia by rebalancing optic atrophy 1 processing. *Free Radical Biology and Medicine*. 2019, 145, 187-197. ISSN 08915849.
  65. LIU, H., Y. DONG, Y. GAO, et al. The Fascinating Effects of Baicalein on Cancer: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016, 17(10). ISSN 1422-0067.
  66. SOWNDHARARAJAN, K., P. DEEPA, M. KIM, et al. Baicalein as a potent neuroprotective agent: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017, 95, 1021-1032. ISSN 07533322.
  67. SONG, J., L. ZHANG, Y. XU, et al. The comprehensive study on the therapeutic effects of baicalein for the treatment of COVID-19 in vivo and in vitro. *Biochemical Pharmacology*. 2021, 183. ISSN 00062952.
  68. LIANG, W., X. HUANG a W. CHEN. The Effects of Baicalin and Baicalein on Cerebral Ischemia: A Review. *Aging and disease*. 2017, 8(6). ISSN 2152-5250.
  69. DE OLIVEIRA, M. R., S. F. NABAVI, S. HABTEMARIAM, et al. The effects of baicalein and baicalin on mitochondrial function and dynamics: A review. *Pharmacological Research*. 2015, 100, 296-308. ISSN 10436618.
  70. NABAVI, S. F., N. BRAIDY, O. GORTZI, et al. Luteolin as an anti-inflammatory and neuroprotective agent: A brief review. *Brain Research Bulletin*. 2015, 119, 1-11. ISSN 03619230.
  71. IMRAN, M., A. RAUF, T. ABU-IZNEID, et al. Luteolin, a flavonoid, as an anticancer agent: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019, 112. ISSN 07533322.

72. GERGES, S. H., S. A. WAHDAN, D. A. ELSHERBINY, et al. Pharmacology of Diosmin, a Citrus Flavone Glycoside: An Updated Review. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2022, 47(1), 1-18. ISSN 0378-7966.
73. SOUHRN ÚDAJŮ O PŘÍPRAVKU: FLEBAZOL. Praha: Státní úřad pro kontrolu léčiv. [cit. 2023-01-12]
74. NAZ, S., M. IMRAN, A. RAUF, et al. Chrysin: Pharmacological and therapeutic properties. *Life Sciences*. 2019, 235. ISSN 00243205.
75. MANI, R. a V. NATESAN. Chrysin: Sources, beneficial pharmacological activities, and molecular mechanism of action. *Phytochemistry*. 2018, 145, 187-196. ISSN 00319422.
76. PEREZ-VIZCAINO, F. a J. DUARTE. Flavonols and cardiovascular disease. *Molecular Aspects of Medicine*. 2010, 31(6). ISSN 00982997.
77. FLAMINI, R., F. MATTIVI, M. ROSSO, et al. Advanced Knowledge of Three Important Classes of Grape Phenolics: Anthocyanins, Stilbenes and Flavonols. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013, 14(10), 19651-19669. ISSN 1422-0067.
78. MANACH, C. a J. L. DONOVAN. Invited Review. *Free Radical Research*. 2004, 38(8), 771-785. ISSN 1071-5762.
79. KADLECOVÁ, K. Hledání přírodních chelátorů kobaltu. Hradec Králové. 2022. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky. Vedoucí práce Karlíčková, Jana.
80. PubChem Compound Summary for CID 11349, 3-Hydroxyflavone [online]. National Center for Biotechnology Information, 2023. [cit. 2023-01-06]
81. CHEBI:5078 - flavonol. ChEBI [online]. Cambridge: EMBL-EBI, 2018. [cit. 2023-02-07]
82. PATEL, R. V., B. M. MISTRY, S. K. SHINDE, et al. Therapeutic potential of quercetin as a cardiovascular agent. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2018, 155, 889-904. ISSN 02235234.
83. RAUF, A., M. IMRAN, I. A. KHAN, et al. Anticancer potential of quercetin: A comprehensive review. *Phytotherapy Research*. 2018, 32(11), 2109-2130. ISSN 0951418X.
84. REN, J., Y. LU, Y. QIAN, et al. Recent progress regarding kaempferol for the treatment of various diseases (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2019. ISSN 1792-0981.
85. ANDRES, S., S. PEVNY, R. ZIEGENHAGEN, et al. Safety Aspects of the Use of Quercetin as a Dietary Supplement. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2018, 62(1). ISSN 16134125.
86. DEVI, K. P., D. S. MALAR, S. F. NABAVI, et al. Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine. *Pharmacological Research*. 2015, 99, 1-10. ISSN 10436618.
87. SOLAIRAJA, S., M. Q. ANDRABI, N. R. DUNNA, et al. Overview of Morin and Its Complementary Role as an Adjuvant for Anticancer Agents. *Nutrition and Cancer*. 2021, 73(6), 927-942. ISSN 0163-5581.
88. CASELLI, A., P. CIRRI, A. SANTI, et al. Morin: A Promising Natural Drug. *Current Medicinal Chemistry*. 2016, 23(8), 774-791. ISSN 09298673.

89. GANESHPURKAR, A. a A. K. SALUJA. The Pharmacological Potential of Rutin. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2017, 25(2), 149-164. ISSN 13190164.
90. CHUA, L. S. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*. 2013, 150(3), 805-817. ISSN 03788741.
91. NEGAHDARI, R., S. BOHLOULI, S. SHARIFI, et al. Therapeutic benefits of rutin and its nanoformulations. *Phytotherapy Research*. 2021, 35(4), 1719-1738. ISSN 0951-418X.
92. SOUHRN ÚDAJŮ O PŘÍPRAVKU: GINKOR FORT tvrdé tobolky. Praha: Státní úřad pro kontrolu léčiv. [cit. 2023-01-15]
93. AHMADI, Z., R. MOHAMMADINEJAD, S. ROOMIANI, et al. Biological and Therapeutic Effects of Troxerutin: Molecular Signaling Pathways Come into View. *Journal of Pharmacopuncture*. 2021, 24(1), 1-13. ISSN 2093-6966.
94. ZAMANIAN, M., G. BAZMANDEGAN, A. SUREDA, et al. The Protective Roles and Molecular Mechanisms of Troxerutin (Vitamin P4) for the Treatment of Chronic Diseases: A Mechanistic Review. *Current Neuropharmacology*. 2020, 19(1), 97-110. ISSN 1570159X.
95. SHENG, Z., H. DAI, S. PAN, et al. Isolation and Characterization of an  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitor from *Musa* spp. (Baxijiao) Flowers. *Molecules*. 2014, 19(7), 10563-10573. ISSN 1420-3049.
96. PROENÇA, C., M. FREITAS, D. RIBEIRO, et al. A-Glucosidase inhibition by flavonoids: an in vitro and in silico structure–activity relationship study. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2017, 32(1), 1216-1228. ISSN 1475-6366.
97. BAI, L., X. LI, L. HE, et al. Antidiabetic Potential of Flavonoids from Traditional Chinese Medicine: A Review. *The American Journal of Chinese Medicine*. 2019, 47(05), 933-957. ISSN 0192-415X.
98. RUDÁ-KUČEROVÁ, J. a D. KOUPÝ. Účinnost fytoterapie v léčbě diabetes mellitus 2. typu. *Interní medicína pro praxi*. 2015, 17(5), 240-243. ISSN 1212-7299.
99. ŞÖHRETOĞLU, D. a S. SARI. Flavonoids as alpha-glucosidase inhibitors: mechanistic approaches merged with enzyme kinetics and molecular modelling. *Phytochemistry Reviews*. 2020, 19(5), 1081-1092. ISSN 1568-7767.
100. XIAO, J., G. KAI, K. YAMAMOTO, et al. Advance in Dietary Polyphenols as  $\alpha$ -Glucosidases Inhibitors: A Review on Structure-Activity Relationship Aspect. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2013, 53(8), 818-836. ISSN 1040-8398.

## 10. ZDROJE OBRÁZKŮ A TABULEK

**Obrázek č. 1:** Chemická struktura akarbosy vytvořená v programu ChemDraw.

**Obrázek č. 2:** Struktura intestinálního enzymu  $\alpha$ -glukosidasy (3.2.1.20) s navázanou akarbosou v aktivním místě; převzato a upraveno – JIANG, J. a S. GHOSH. Glucosidase. RCSB Protein Data Bank [online]. ISSN 1234-432X.

**Obrázek č. 3 – 28:** Chemické struktury jednotlivých flavonoidů a jejich základních struktur vytvořené v programu ChemDraw.

**Obrázek č. 29 – 35:** Grafické znázornění závislosti inhibiční aktivity flavonoidů na jejich koncentraci s použitím 95% konfidenčních intervalů. Vytvořeno v programu GraphPad.

**Obrázek č. 36 – 39:** Srovnání inhibiční účinnosti vybraných flavonoidů s akarbosou při použití 95% konfidenčních intervalů. Vytvořeno v programu GraphPad.

**Obrázek č. 40:** Vyznačení důležitých strukturálních prvků na molekule flavonoidu. Vytvořeno v programu Chemdraw.