

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMAKOLOGIE A FARMACEUTICKEJ BOTANIKY

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Vplyv benzoových kyselín (metabolitov flavonoidov) na meďou katalyzovanú
Fentonovu reakciu a hemolýzu

Vedúci diplomovej práce: Mgr. Zuzana Lomozová, Ph.D.

Vedúci katedry: Prof. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Hradec Králové, 2023

Patrícia Harčárová

CHARLES UNIVERSITY

FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRÁLOVÉ

DEPARTMENT OF PHARMACOGNOSIS AND PHARMACEUTICAL BOTANY

DIPLOMA THESIS

**Effect of benzoic acids (flavonoid metabolites) on copper catalyzed Fenton
reaction and hemolysis**

Supervisor: Zuzana Lomozová, MSc., Ph.D.

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

Hradec Králové, 2023

Patrícia Harčárová

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom, ktoré som vypracovala samostatne pod vedením Mgr. Zuzany Lomozovej, Ph.D. Všetka použitá literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovávaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Práca nebola využitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.

POĎAKOVANIE

Rada by som touto cestou poďakovala vedúcej mojej diplomovej práce Mgr. Zuzane Lomozovej, Ph.D. za odborné vedenie, cenné rady v celom procese riešenia diplomovej práce a taktiež za pomoc pri spracovaní experimentálnej časti.

Taktiež by som sa chcela poďakovať Skupine kardiovaskulárnej a respiračnej farmakológie a toxikológie za poskytnutie materiálu a potrebného vybavenia k realizácii diplomovej práce a aj doc. Radimovi Kučerovi, Ph.D. za poskytnutie laboratória a prístroja na vykonanie experimentálnej časti.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakognózie a farmaceutickej botaniky

Študentka: Patrícia Harčárová

Školiteľ: Mgr. Zuzana Lomozová, Ph.D.

Názov diplomovej práce: Vplyv benzoových kyselín (metabolitov flavonoidov) na meďou katalyzovanú Fentonovu reakciu a hemolýzu

Kľúčová slova: flavonoidy, benzoové kyseliny, meď, Fentonova reakcia, hemolýza

Meď je biogénny stopový prvok, ktorý je v ľudskom tele súčasťou niekoľkých enzýmov a proteínov. Schopnosť medi meniť oxidačný stav je zásadný pre jej biologické funkcie a umožňuje enzymatické redoxné reakcie v organizme. Homeostáza medi je v ľudskom tele prísne regulovaná, pretože jej narušením môže dôjsť k toxickému pôsobeniu medi.

Flavonoidy sú sekundárne metabolity rastlín, ktoré sú bežnou súčasťou našej stravy a ich konzumácia má pozitívne účinky na náš organizmus. Za určitých podmienok však môžu mať tiež pro-oxidačné pôsobenie, ktoré súvisí s ich schopnosťou redukovať ióny prechodných kovov. Flavonoidy sú v ľudskom tele masívne metabolizované ešte pred dosiahnutím systémového obehu na malé fenolické látky, medzi ktoré patria aj benzoové kyseliny.

V rámci tejto diplomovej práce bolo testovaných sedem derivátov kyseliny benzoovej. Pomocou HPLC metódy sme stanovili ich vplyv na produkciu hydroxylových radikálov vznikajúcich počas meďou-katalyzovanej Fentonovej reakcie pri dvoch (pato)fyziologických hodnotách pH (4,5 a 7,5). Najvyššiu antioxidačnú aktivitu pri oboch hodnotách pH vykazovala kyselina 2,4-dihydroxybenzoová. Naproti tomu kyselina 2,4,6-trihydroxybenzoová a kyselina benzoylaminoctová vykazovali pro-oxidačný účinok.

Následne bolo k overeniu antioxidačného alebo pro-oxidačného pôsobenia testovaných látok použité stanovenie vplyvu na meďou-navodenú lýzu potkaních erytrocytov. Ani jedna z testovaných zlúčenín nebola schopná ochrániť potkanie erytrocyty pred toxicitou medi. Naopak kyselina 2,4,6-trihydroxybenzoová a kyselina 3-hydroxybenzoová hemolýzu ešte zhoršili.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany

Student: Patrícia Harčárová

Supervisor: Zuzana Lomozová, MSc., Ph.D.

Title of diploma thesis: Effect of benzoic acids (flavonoid metabolites) on copper catalyzed Fenton reaction and hemolysis

Keywords: flavonoids, benzoic acids, copper, Fenton reaction, hemolysis

Copper is a biogenic trace element that is present in several enzymes and proteins in the human body. The ability of copper to change its oxidation state is essential for its biological functions and enables enzymatic redox reactions in the organism. Homeostasis of copper is strictly regulated in the human body as its disruption can lead to the toxic effects of copper.

Flavonoids are secondary plant metabolites that are a common part of our diet and their consumption has positive effects on our bodies. However, under certain conditions, they can also have a pro-oxidative effect, which is related to their ability to reduce transition metal ions. Flavonoids are massively metabolized in the human body before reaching systemic circulation into small phenolic substances including benzoic acids.

Seven benzoic acid derivatives were tested as part of this thesis. Their influence on the production of hydroxyl radicals arising during the copper-catalyzed Fenton reaction at two (patho)physiological pH values (4.5 and 7.5) was determined using the HPLC method. 2,4-dihydroxybenzoic acid showed the highest antioxidant activity at both pH values. In contrast, 2,4,6-trihydroxybenzoic acid and benzoylaminoacetic acid showed a pro-oxidative effect.

Subsequently, the determination of the effect on copper-induced lysis of rat red blood cells was used to verify the antioxidant or pro-oxidative action of the tested substances. None of the tested compounds exhibited the ability to protect rat erythrocytes from copper toxicity. On the contrary, 2,4,6-trihydroxybenzoic acid and 3-hydroxybenzoic acid led to the worsening of hemolysis.

OBSAH

1. Zoznam skratiek	1
2. Úvod	3
3. Teoretická časť	4
3.1 Fyziológia medi	4
3.1.1 Med' ako prvok	4
3.1.2 Med' v ľudskom organizme	4
3.1.3 Enzýmy obsahujúce med' a ich úloha v organizme	5
3.1.4 Príjem medi v potrave	7
3.1.5 Absorpcia medi.....	8
3.1.6 Homeostáza medi v bunke	9
3.2 Patológia medi	12
3.2.1 Nadbytok medi v organizme	12
3.2.2 Nedostatok medi v organizme	12
3.2.3 Toxicita medi	13
3.2.4 Dedičné ochorenia	14
3.2.5 Neurodegeneratívne ochorenia	17
3.2.6 Ostatné ochorenia	18
3.3 Flavonoidy.....	20
3.3.1 Biosyntéza flavonoidov	20
3.3.2 Vlastnosti flavonoidov	21
3.3.3 Základná štruktúra flavonoidov	21
3.3.4 Podskupiny flavonoidov	22
3.3.5 Metabolizmus flavonoidov	26
3.3.6 Antioxidačná aktivita flavonoidov	27
3.3.7 Pro-oxidačná aktivita flavonoidov	28
3.3.8 Ďalšie účinky flavonoidov na ľudské zdravie	29
3.4 Testované látky.....	31
4. Cieľ práce.....	34
5. Experimentálna časť.....	35
5.1 Použitý materiál a pomôcky	35

5.1.1	Chemikálie	35
5.1.2	Prístroje a pomôcky.....	36
5.1.3	Biologický materiál	37
5.2	Metodický postup.....	38
5.2.1	HPLC metóda	38
5.2.2	Lýza červených krviniek.....	40
5.3	Matematické a štatistické vyhodnotenie	43
5.3.1	HPLC metóda	43
5.3.2	Lýza červených krviniek.....	43
6.	Výsledky	44
6.1	HPLC metóda	44
6.2	Lýza červených krviniek	49
7.	Diskusia	53
8.	Záver.....	57
9.	Zoznam použitej literatúry.....	58

1. Zoznam skratiek

DNA	Deoxyribonukleová kyselina
TYRP	Tyrozín príbuzné proteíny
MAO	Monoaminoxidáza
LOX	Lyzyloxidáza
SOD	Superoxid dismutáza
DMT1	Transportér divalentného kovu
ATP-áza	Adenozintrifosfatáza
ATP7A	Aktívny transportér medi 7A
ATP7B	Aktívny transportér medi 7B
ATOX1	Chaperón pre ATP-ázy ATP7A a ATP7B
MT	Metalothioneín
GSH	Glutathion
ROS	Reaktívne formy kyslíka, z angl. reactive oxygen species
OHS	Syndróm okcipitálneho laloku
CCS	Chaperón pre superoxid dismutázu
COX17	Chaperón pre cyklooxygenázu
CTR1	Selektívni transportér medi, z angl. copper transporter 1
WD	Wilsonova choroba, z angl. Wilson's disease
MD	Menkesova choroba, z angl. Menkes disease
CNS	Centrálny nervový systém
PD	Parkinsonova choroba, z angl. Parkinsons disease
AD	Alzheimerova choroba, z angl. Alzheimer disease
CoA	Koenzým A
HEPES	Kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazínethansulfónová
LDH	Laktátdehydrogenázová aktivita
HPLC	Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
2,3-DHBA	Kyselina 2,3-dihydroxybenzoová
2,5-DHBA	Kyselina 2,5-dihydroxybenzoová
NAD ⁺	Nikotínamid adenín dinukleotid

TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPPH•	1,1-difenyl-2-(2,4,6- trinitrofenyl)hydrazyl
ABTS+•	2,2'- azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)

2. Úvod

Meď je esenciálny stopový prvok, ktorý sa ako súčasť mnohých enzýmov a iných proteínov vyskytuje v ľudskom tele. Kvôli svojej redoxnej aktivite sa podieľa na životne dôležitých reakciách, ako napríklad bunečné dýchanie a odstraňovanie voľných radikálov. Hladina medi v organizme musí byť prísne regulovaná, lebo pri poškodení homeostatických mechanizmov sa môže zvýšiť koncentrácia voľnej medi, ktorá sa následne podieľa na tvorbe reaktívnych foriem kyslíka prostredníctvom Fentonovej a Haber-Weissovej reakcie a tým aj na rozvoji oxidačného stresu.

Flavonoidy sú sekundárne metabolity rastlín s polyfenolickou štruktúrou, ktoré sa nachádzajú nielen v ovocí a zelenine, ale aj v nápojoch rastlinného pôvodu, ako je čaj a víno. Flavonoidy prijímame vo forme potravy, a preto je dôležité, aby sme preskúmali ich pozitívny vplyv na náš organizmus. Na základe predošlých epidemiologických štúdií môžeme predpokladať napríklad ich antioxidantný, kardioprotektívny a aj antiflogistický účinok. Ich antioxidantná aktivita sa pripisuje schopnosti vychytávať voľné radikály, chelatovať ióny prechodných kovov alebo inhibovať enzýmy zodpovedné za tvorbu reaktívnych foriem kyslíka. Avšak niektoré flavonoidy vykazovali aj nežiaducu pro-oxidačnú aktivitu, čo viedlo naopak k zvýšeniu koncentrácie voľných radikálov.

Flavonoidy sa pred vstupom do systémového obehu vo veľkej miere degradujú vplyvom črevnej mikroflóry na jednoduché fenolické zlúčeniny. Radíme sem deriváty kyseliny benzoovej, u ktorých bola v minulosti tiež pozorovaná antioxidantná ale aj pro-oxidačná aktivita, v závislosti na polohe a počte hydroxylových skupín naviazaných na benzénovom jadre. Z tohto dôvodu je táto diplomová práca zameraná na stanovenie vplyvu benzoových kyselín na meďou-katalyzovanú Fentonovu reakciu a hemolýzu.

3. Teoretická časť

3.1 Fyziológia medi

3.1.1 Med' ako prvok

Med' je červenooranžový kov, ktorý patrí medzi prechodné kovy. Latinsky označujeme med' slovom Cuprum, čo je odvodené od pôvodného popisu medi Cyprium aes, v preklade kov z Cypru. V prírode sa vyskytuje v zmesi dvoch stabilných a nerádioaktívnych izotopov ^{63}Cu a ^{65}Cu . V periodickej sústave prvkov je med' označená symbolom Cu a patrí do skupiny I.B a je v 4.perióde s atómovým číslom 29. Je súčasťou d-bloku a jeho elektrónová konfigurácia je $[\text{Ar}] 4s^1 3d^{10}$ [1].

Je to ušľachtilý kov a medzi jeho významné priemyselné vlastnosti patrí vysoká vodivosť tepla a elektriny, kujnosť, tvárnosť a nízka korózia. Tvorí množstvo zlúčenín v oxidačnom stave +1 ale najčastejšie sa vyskytuje vo forme +2. Za špeciálnych okolností môžeme pripraviť aj zlúčeniny trojmocnej medi [1].

3.1.2 Med' v ľudskom organizme

Med' je esenciálny stopový prvok, ktorý sa radí medzi tretí najrozšírenejší stopový prvok v tele po zinku a železe [2]. Nachádza sa takmer v každej bunke tela a jeho najvyššia koncentrácia je v mozgu, pečeni, srdci, žlči a v obličkách. Taktiež aj kosti a svaly obsahujú veľké množstvo medi, pretože tvoria veľkú časť nášho tela [3].

Prítomnosť medi v organizme je kľúčová pre správny rast a vývoj kostí, metabolizmus cholesterolu a glukózy, pri tvorbe spojivového tkaniva a dôležitý je aj pri kontraktilite myokardu a vývoji mozgu. Podieľa sa na absorpcii a transporte železa, teda podporuje tvorbu červených krviniek a hemoglobínu. Vďaka schopnosti stimulovať imunitný systém je dôležitý pri obrane proti infekciám [4]. Taktiež je dôležitý pri bunkovom dýchaní, bunkovej proliferácii a pri odstraňovaní voľných radikálov. Med' nachádzajúca sa vo fyziologických hladinách je dôležitá pre správne fungovanie organizmu, avšak pri nadbytku pôsobí toxicky. Preto náš organizmus vyvinul mechanizmy na príjem, distribúciu, skladovanie a vylučovanie medi [5].

Najčastejšie sa med' nachádza v živých organizmoch vo forme medňých alebo medňatých iónov. Môže pôsobiť ako akceptor alebo donor elektrónov, teda prechádzať

z jedného oxidačného stavu do druhého, a tým má význam v redoxných reakciách a pri odstraňovaní voľných radikálov, čo je jeden z mechanizmov pôsobenia antioxidantov [6].

3.1.3 Enzýmy obsahujúce meď a ich úloha v organizme

Meď je nielen katalytickým kofaktorom pri redoxných reakciách, ale vďaka svojej elektrónovej štruktúre je taktiež kofaktorom mnohých enzýmov, katalyzujúcich prenos elektrónov, ktoré spoločne nazývame kuproenzýmy [5].

Cytochróm-c-oxidáza je koncový enzým mitochondriálneho dýchacieho reťazca, ktorý sa nachádza na vnútornej membráne mitochondrií. Je zodpovedný za prenos elektrónov z cytochrómu c na molekulárny kyslík a tým dochádza k jeho redukcii na vodu. Súčasne pôsobí aj ako protónová pumpa, ktorá umožní prenos protónov do medzimembránového priestoru, čím dochádza k vytvoreniu elektrochemického gradientu, ktorý sa použije na vznik energie vo forme adenozíntrifosfátu (ATP) [7]. Skladá sa z 13 podjednotiek a z toho sú tri kódované mitochondriálnou deoxyribonukleovou kyselinou (DNA) a desať jadrovou DNA. Patrí medzi jedno z hlavných regulačných miest pre oxidačnú fosforyláciu [8].

Tyrozínáza je glykozylovaná oxidáza dôležitá v procese prebiehajúcom v epiderme nazývanom melanogéza. Je to proces, pri ktorom sa produkuje pigment melanín v melanozómoch, čo sú organely v melanocytoch [9]. Pri biosyntéze melanínu sa vyžaduje prítomnosť nielen tyrozínázy, ale aj tyrozín príbuzných proteínov (TYRP1 a TYRP2). Enzým je zodpovedný za premenu monofenolov na *o*-difenoly a následne je oxidovaný na *o*-chinonové deriváty. Konečným produktom je dopachinón, ktorý je prekursorom melanínu zodpovedného za pigmentáciu pokožky, vlasov a očí [10].

Dopamín- β -hydroxyláza je esenciálny enzým, ktorý katalyzuje posledný krok pri biosyntéze neurotransmiteru noradrenalínu. Svojou prítomnosťou umožňuje premenu dopamínu na noradrenalín pomocou hydroxylácie, ktorá je závislá od Cu^{2+} a askorbátu [11].

Monoaminoxidázy (MAO) patria medzi izoenzýmy nachádzajúce sa na vonkajšej mitochondriálnej membráne a delíme ich na MAO A a MAO B. Umožňujú oxidačnú deamináciu potravinových amínov a monoamínových neurotransmiterov, ako napríklad serotonín, noradrenalín, dopamín a β -fenyletylamín [12]. MAO A sa nachádza v gastrointestinálnom trakte, pľúcach, pečeni a v placentе. Medzi hlavné substráty radíme biogénne amíny, ako je napríklad dopamín a epinefrín, ktoré sa menia na odpovedajúce aldehydy. MAO B je v krvných doštičkách a medzi jeho substráty radíme najmä 2-fenyletylamín a benzylamín [13].

Hefaestín je transmembránová feroxidáza nachádzajúca sa na bazolaterálnej membráne enterocytov, ktorá umožňuje absorpciu železa prijímaného potravou. V potrave prijímame železo buď ako hemový komplex alebo ako nehemové železo, ktoré sa pred vstupom do enterocytov musí redukovať na Fe^{2+} . Následne sa z enterocytov vylučuje do krvi vo forme Fe^{3+} , čo znamená, že sa najprv musí oxidovať pomocou hefaestínu [14].

Ceruloplazmín je sérová feroxidáza syntetizovaná v pečeni, ktorá sa podieľa na udržiavaní homeostázy medi a železa. Viac ako 90 % medi sa v sére nachádza vo forme ceruloplazmínu, ktorý ju dodáva tkanivám pomocou transportérov v ich bunčnej membráne. Okrem toho má tiež dôležitú úlohu aj pri oxidácii železnatých iónov na železité, čím napomáha väzbe Fe^{3+} na transportný proteín transferín [15].

Lsyloxidáza (LOX) je enzým zodpovedný za kovalentné zosieťovanie proteínov extracelulárnej matrice. Umožňuje oxidáciu lyzínových zvyškov v elastíne a kolagénne, čo spôsobí stabilitu týchto proteínov. LOX vychádza z bunky ako preproteín a potom sa proteolýzou premení na aktívny enzým. Dôležitou súčasťou ich štruktúry je prítomnosť medeného a karbonylového kofaktoru [16].

Superoxiddizmutáza (SOD) patriaca medzi metaloenzýmy sa nachádza v cytosole a v mitochondriálnej medzimembráne. Jeho úloha spočíva v neutralizácii voľných radikálov, a tým bráni rozvoju oxidačného stresu v tele. Katalyzuje premenu radikálu superoxidového aniónu na peroxid vodíka a molekulu kyslíka. Následne sa musí peroxid vodíka redukovať na vodu, pretože pri nadbytku môže vytvárať reaktívne formy kyslíka [17].

Tab. 1. Stručný prehľad enzýmov obsahujúcich meď a ich účinok.

Enzýmy	Funkcia
Cytochróm-c-oxidáza	Bunečné dýchanie
Tyrozínáza	Biosyntéza melanínu
Dopamín- β -hydroxyláza	Biosyntéza katecholamínov
Monoaminoxidázy	Syntéza neurotransmiterov
Hefaestín	Transport železa do obehu
Ceruloplazmín	Transport medi a oxidácia Fe^{2+}
Lsyloxidáza	Tvorba kolagénovej a elastínovej siete
Superoxiddizmutáza	Neutralizácia voľných radikálov

3.1.4 Príjem medi v potrave

Meď ako esenciálny prvok musíme prijímať vo forme potravy. Odporučená denná dávka sa líši podľa veku jedinca. Doporučený denný príjem vo veku od 0-6 mesiacov je 200 µg/deň, u detí od 7-12 mesiacov je 220 µg/deň, od 1-3 rokov je 340 µg/deň, od 4-8 rokov 440 µg/deň, od 9-18 rokov 700 µg/deň a nad 18 rokov okolo 900 µg/deň. Potreba medi je zvýšená u žien v období gravidity a laktácie, kedy sa doporučený denný príjem pohybuje okolo 1000 – 1300 µg/deň [18].

Maximálna denná dávka medi u dospelého človeka je 10 mg/deň, aby sme predišli prípadnej toxicite. Toxicita medi spôsobená zvýšeným príjmom v potrave však nie je častá vďaka mechanizmom na udržanie jej homeostázy. Celkový obsah medi u dospelého človeka sa pohybuje okolo 100 mg [18].

Obsah medi v potravinách sa líši na základe lokality, kvality pôdy, použitých hnojív a iných faktorov využívaných pri pestovaní. Aj na základe vplyvu týchto faktorov pokladáme za dobré zdroje medi vnútornosti, orechy, ale aj obilniny a ovocie. Nízke množstvá medi obsahuje mlieko a mliečne výrobky. Zdrojom medi môže byť aj pitná voda, v ktorej sa množstvo medi líši podľa zloženia a podľa prítomnosti medeného potrubia [19].

Tab. 2. Približný obsah medi v potravinách [19].

Potraviny	Obsah medi (mg/kg)
Mlieko	0,1 – 0,88
Jablká	0,1 – 2,3
Pečeň	157,0
Zemiaky	0,48 – 16,0
Mrkva	0,37 – 0,62
Paradajky	0,1 – 3,4
Banány	0,7 – 3,0
Tuniak	0,1 – 1,2
Losos	0,5 – 0,8
Krevety	2,0 – 2,9

3.1.5 Absorpcia medi

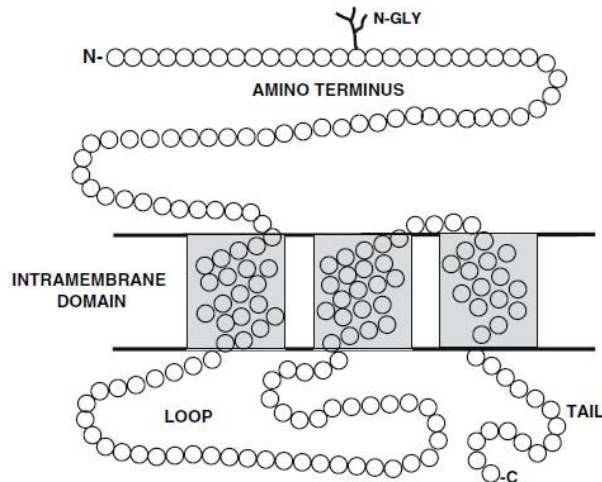
Meď prijímaná v potrave sa najviac vstrebáva v hornej časti tenkého čreva nazývanej dvanástnik. Meď sa absorbuje do enterocytov najmä cez energeticky nezávislý transportér CTR1, ktorý sa nachádza na ich apikálnej strane. Ten prenáša meď len vo forme Cu^+ , a preto sa musí pred absorpciou redukovať z formy Cu^{2+} , v ktorej sa nachádza v potravinách [20]. Absorpcia medi potravou závisí od celkovej koncentrácie medi v organizme a od množstva medi v potrave. Ak prijímame menej ako 1 mg medi denne, tak sa absorpcia pohybuje nad 50 %, ale pri príjme nad 5 mg denne je absorpcia menej ako 20 % [21].

Meď sa absorbuje do enterocytov na apikálnej strane a vylučuje sa na bazolaterálnej pomocou transportéru ATP7A do portálnej žily, kde sa viaže primárne na plazmatický proteín albumín, prípadne na transkuprein a následne je transportovaná do pečene. Pečeň je dôležitým orgánom pri regulácii systémovej homeostázy medi. Meď sa vstrebáva do hepatocytov pomocou transportéru hCTR1 a následne sa rozhoduje, či bude skladovaná v hepatocytoch, alebo sa vylúči do krvnej plazmy, kde sa viaže na plazmatické proteíny ako ceruloplazmín prípadne albumín a je distribuovaná do buniek na periférii [20].

Naše telo je schopné kontrolovať množstvo medi v organizme, a to buď zníženou absorpciou v črevách alebo zvýšeným vylučovaním [22]. Aby sme predišli nadbytočnej koncentrácii medi v bunkách, dochádza u dospelého jedinca k vylúčeniu v priemere 0,5 – 1,3 mg medi denne [23]. O množstve vylúčenej medi z organizmu rozhodujú taktiež hepatocyty, ktoré pomocou transportéra ATP7B transportujú nadbytok medi do žlče s cieľom jej vylúčenia. V nepatrnom množstve sa môže vylúčiť aj močom [22].

Dôležitou súčasťou pri absorpcii medi je prítomnosť transportného proteínu CTR1, ktorý je dôležitý nielen pri príjme medi v potrave ale aj pri periférnej distribúcii, čím pozitívne ovplyvňuje vývoj organizmu [24]. Štrukturálne sa skladá z troch transmembránových domén, ktoré sú zložené z identických monomérov a každý z nich pozostáva zo 190 aminokyselín. Pozostáva z C-konca, ktorý je otočený intracelulárne a obsahuje najmä aminokyseliny cysteín a histidín. Na extracelulárnej strane sa nachádza N-koniec proteínu, ktorý sa N- a O-glykozylovaním chráni pred proteolýzou. V bunečnej membráne vytvára tento transportér pór, čím uľahčuje vstup medi do bunky. Transportná aktivita CTR1 nie je ovplyvnená zinkom ani inými dvojmocnými kovmi [25].

Absorpcia medi z potravy je umožnená z enterocytov nielen pomocou už zmieneného transportéra CTR1, ktorý prenáša len monovalentné kovové ióny, ale taktiež aj transportérom divalentného kovu 1 (DMT1), ktorý má nešpecifickú afinitu k dvojmocným kovom medzi, ktoré patria Fe^{2+} , Cu^{2+} a Zn^{2+} ióny [24].



Obr. 1. ŠTRUKTÚRA TRANSPORTNÉHO PROTEÍNU CTR1. CTR1 sa skladá z glykovaného N-konca smerujúceho extracelulárne, troch transmembránových pórov a C-konca smerujúceho intracelulárne [26].

3.1.6 Homeostáza medi v bunke

Po vstupe redukovanej medi do bunky cez vysokoafinitný transportér CTR1 sa meď v menšej miere viaže na glutathion (GSH) za vzniku komplexu a časť medi sa viaže na medené chaperóny ATOX1, CCS a COX17, ktoré v bunke slúžia na dodanie medi k intracelulárnym proteínom. V bunke sa za fyziologických podmienkach vyskytuje voľná meď zriedkavo, čím sa bráni vzniku voľných radikálov [27].

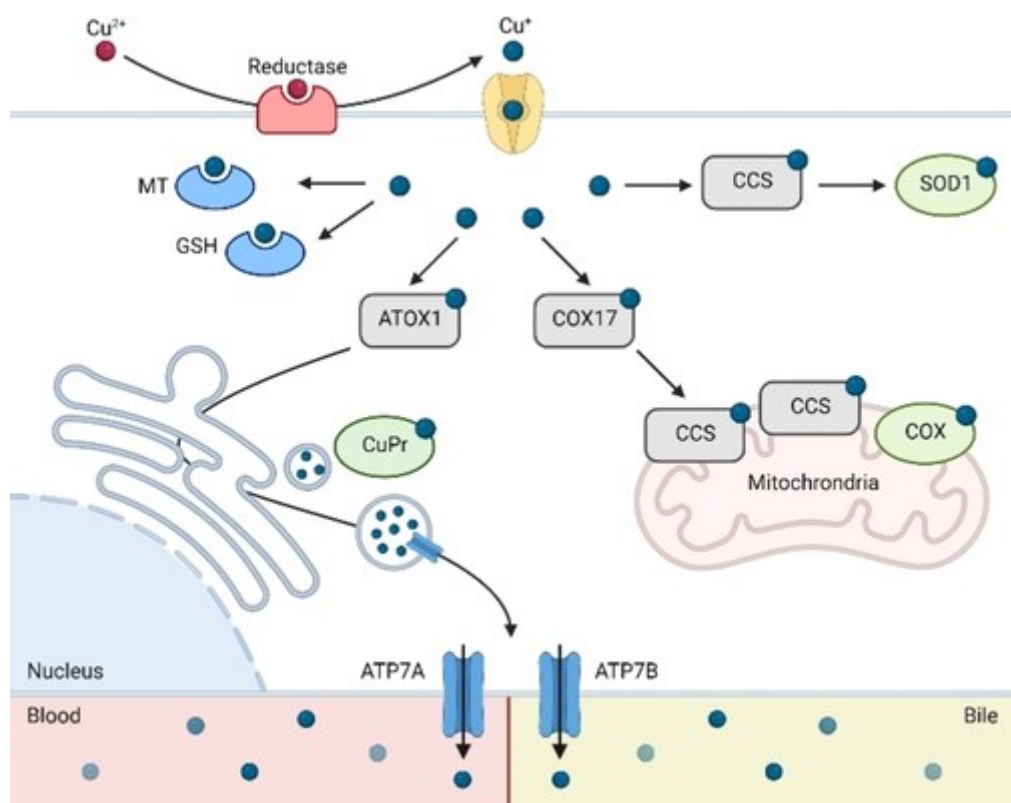
Glutathion sa štrukturálne radí medzi tripeptidy a je zložený z L-glutamyl-L-cysteinyl-glycínu. Je to bunkový antioxidant nachádzajúci sa hlavne v cytosole a v mitochondriách, ktorého syntéza prebieha v dvojkrokovom procese s využitím ATP. Zistilo sa, že GSH reguluje nielen vstup medi do buniek, ale taktiež udržiava intracelulárnu homeostázu medi. Po vstupe medi do bunky je GSH jej prvým akceptorom, čím potláča toxicitu medi. Následne je vytvorený komplex medi s GSH dodávaný buď medeným chaperónom alebo metalothioneínu (MT) [27].

MT je nízkomolekulárny cytoplazmatický polypeptid s vysokou afinitou k dvojmocným a monovalentným prechodným kovom. Vo svojej štruktúre obsahuje najmä cysteín a jeho hlavná úloha spočíva v regulácii a kontrole voľných iónov kovov, čím chráni bunku proti poškodeniu, ale nemá priamu úlohu pri ich absorpcii. Je charakteristický vysokou afinitou nielen k meďnatým a zinočnatým iónom, ale v menšej miere je schopný viazať aj Cd^{2+} a Hg^{2+} , čím udržiava ich homeostázu a bráni vzniku oxidačného stresu [28].

ATOX1 je cytosolický proteín, ktorého štruktúra sa po naviazaní medi nemení, ale sa stáva pevnejšia. Jeho úloha spočíva v dodávaní medi do Cu-transportujúcich ATP-áz typu P, a to ATP7A a ATP7B, ktoré sa nachádzajú na membráne trans-Golgiho siete. Úlohou ATP-áz je premiestniť meď z cytosolu do lumenu sekrečnej dráhy pomocou energie získanej hydrolýzou ATP. Následne dochádza k začleneniu medi do kuproenzýmov naviazaných na plazmatickej membráne a jej vylúčenie z buniek do extracelulárnej tekutiny. Okrem biosyntetickej úlohy má ATP7B aj úlohu homeostatickú, tým že začleňuje ceruloplazmín do žlče, čo vedie k vylúčeniu prebytočnej medi z bunky [25].

CCS je zložený z troch odlišných domén, ktoré sa skladajú z N-terminálnej domény obsahujúcej väzbové miesto pre meď. Ďalšiu časť medeného chaperónu tvorí centrálna doména, ktorá má sekvenčnú homológiu ako cieľový proteín SOD1 a poslednú časť CCS tvorí C-terminálna doména, ktorá umožňuje prenesenie medi do SOD1 [29]. Je to rozpustný proteín, ktorý obsahuje 274 aminokyselinových zvyškov a primárne sa nachádza v cytosole, ale v malom množstve aj v mitochondriách a v peroxizómoch. Jeho úlohou je nielen začleniť meď do enzýmu SOD1, ale taktiež aj vytvoriť disulfidovú väzbu, čím uľahčuje vstup SOD1 do mitochondrií [25].

COX17 je rozpustný proteín s nízkou molekulovou hmotnosťou, ktorý sa nachádza v cytosole a v medzimembránovom priestore. Je schopný viazať len určité kovové ióny, ako napr. Zn^{2+} alebo Cu^+ , čím sa dokázala jeho vysoká špecifickosť. Má jedno väzbové miesto tvorené dvoma po sebe idúcimi zvyškami cysteínu a jeho úloha spočíva v prenose medi do cytochróm-c-oxidázy potrebnej na udržanie homeostázy medi a pri bunkovom dýchaní v mitochondriách [30].



Obr. 2. METABOLIZMUS MEDI V BUNKE. Meď prechádza do buniek vo forme Cu^+ pomocou transportéra CTR1. Následne sú ióny medi v cytosole reverzibilne viazané metalothioneínom do komplexu Cu-MT alebo po väzbe na medené chaperóny CCS, COX17 a ATOX1 sú prenesené do rôznych bunkových kompartmentoch, ako je Golgiho aparát, mitochondrie a cytoplazmatické retikulum, kde sa meď následne začleňuje do intracelulárnych proteínov. ATP7A je zodpovedný za transport prebytočnej medi z bunky do krvných ciev a ATP7B transportuje časť prebytočnej medi do žlče, ktorá je následne vylúčená z organizmu [31].

3.2 Patológia medi

Naše telo je schopné kontrolovať koncentráciu medi v tkanivách, a to buď zníženou absorpciou v črevách alebo zvýšeným biliárnym vylučovaním. Cieľom týchto mechanizmov je zabrániť vzniku nedostatku alebo nadbytku medi v organizme, a tým predchádzať vzniku rôznych patológií [22].

3.2.1 Nadbytok medi v organizme

Nadbytočné množstvo medi vyvoláva nielen oxidačný stres, ale aj poškodenie DNA. Toxicózu medi delíme na primárnu, ak je príčinou vzniku dedičný metabolický defekt alebo na sekundárnu, ak je spôsobená vysokým príjmom alebo zvýšenou absorpciou medi v potrave, prípadne zníženým vylučovaním medi z organizmu [32]. Ďalšou príčinou môže byť poškodená funkcia nadobličiek a pečene, ktoré sú zodpovedné za tvorbu ceruloplazmínu. Jeho nedostatočná tvorba následne spôsobí biologickú nedostupnosť medi a jej hromadenie [33].

Akútna toxicita spôsobená vysokým príjmom medi je veľmi ojedinelý jav, pretože aby sa prejavili symptómy otravy medi, je potrebné prijať množstvo medi v gramoch. Medzi najčastejšie ciele akútnej toxicity patrí gastrointestinálny, pečeneňový, renálny a kardiovaskulárny systém zahrňujúci symptómy, ako napríklad nevoľnosť, hnačku, žltáčku, hematúriu, zlyhanie obličiek, tachykardiu, hypotenziu a bolesť brucha. Medzi symptómy chronickej toxicity medi patria prejavy WD a Menkesovy choroby (MD) [34].

Na zistenie zvýšeného množstva medi v tele sa používa analýza krvi, moču a vlasov. Sledujeme najmä sérovú koncentráciu medi a ceruloplazmínu, ktorého množstvo je regulované v pečeni na základe dostupnosti medi [33].

3.2.2 Nedostatok medi v organizme

Nedostatok medi sa vyskytuje nielen pri nedostatočnom príjme medi v potrave, ale aj u jedincov so zvýšenými nárokmi na meď. Najčastejšie ide o predčasne narodené deti, ktoré potrebujú pre urýchlenie rastu zvýšené množstvo medi, avšak ich pečeneňové zásoby sú nízke. Taktiež nedostatok medi bol zistený u ľudí z rozvojových krajín, ktoré trpia na podvýživu a aj dlhodobé užívanie zinku ako antagonistu medi spôsobuje jeho sekundárny nedostatok. Ďalšou príčinou nedostatku medi je výskyt malabsorpčných syndrémov a perzistujúci nefrotický syndrém, ktoré sú zodpovedné za zvýšené straty medi [22].

Najčastejšie sa nedostatok medi prejavuje anémiou a neutropéniou. V menšej miere sa môže objaviť aj strata pigmentácie vlasov, zvýšený výskyt infekcií, zmeny v metabolizme cholesterolu a glukózy, prípadne kardiovaskulárne zmeny [35].

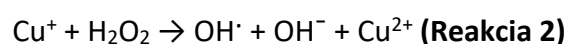
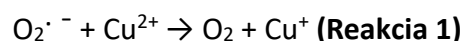
Za fyziologických podmienok sa hladiny sérovej medi pohybujú v rozpätí 10,1-24,6 $\mu\text{mol/l}$ a u ceruloplazmínu je to 180-400 mg/l. Tieto hladiny sa menia v závislosti od veku a pohlavia jedinca. Nameraním znížených koncentrácií medi a ceruloplazmínu v sére dokazujeme iba stredné až vysoké hladiny nedostatku medi. Na dokazovanie mierneho nedostatku medi využívame zníženú aktivitu erytrocytovej SOD a cytochrómu c v krvných doštičkách [35].

3.2.3 Toxicita medi

Meď sa za fyziologických podmienok nachádza v organizme viazaná na proteíny alebo transportné molekuly, avšak pri poškodení homeostatických mechanizmov sa nachádza vo zvýšenej miere voľná vo forme Cu^+ alebo Cu^{2+} . Voľná meď je pre náš organizmus toxická, pretože katalyzuje reakcie, pri ktorých dochádza k tvorbe vysoko reaktívnych foriem kyslíka (ROS), čo vedie k poškodeniu buniek, prípadne k bunkovej smrti [36].

Taktiež sa predpokladá významná úloha voľnej medi ale aj železa pri ischemicko-reperfúznom poškodení tkaniva. Tieto zistenia potvrdzuje vysoká koncentrácia voľnej medi a železa v koronárnom toku po predĺženej ischémii, ktoré následne spôsobujú poškodenie tkaniva [37].

Voľná meď tvorí ROS nielen prostredníctvom Fentonovej a Haber-Weissovej reakcie, ale taktiež svojou zvýšenou koncentráciou v bunke spôsobuje zníženú hladinu GSH schopného viazať voľnú meď v bunke. Následne sa nedostatkom GSH zvyšuje katalytická aktivita medi, čo sa prejaví zvýšenou hladinou ROS. Cu^{2+} sa pomocou prirodzených redukčných činidiel, medzi ktoré patria kyselina askorbová a redukovaný glutathion, alebo v prítomnosti superoxidového aniónu redukuje na Cu^+ . Ide o Haber-Weissovú reakciu (Reakcia 1) a následne dochádza k Fentonovej reakcii, pri ktorej vytvorený Cu^+ reaguje s peroxidom vodíka za vzniku hydroxylového radikálu, ktorý je extrémne reaktívny (Reakcia 2) [38].



Výsledkom týchto reakcií sú vysoké hladiny ROS v organizme, ktoré sú zodpovedné za peroxidáciu lipidov v membránach, oxidáciu proteínov a oxidačné poškodenie DNA a RNA. Ich aktivitou dochádza k rôznym ochoreniam, ako je rakovina, neurologické poruchy, cukrovka, ateroskleróza a iné [39].

Rovnako ako nadbytok medi aj jeho nedostatok je zodpovedný za zvýšenú tvorbu ROS. Nedostatkom medi dochádza k ovplyvneniu obranného systému tým, že sa znižuje aktivita antioxidantného enzýmu SOD a zvyšuje sa aktivita superoxidového aniónu. Aby sme chránili bunky pred škodlivými vlastnosťami ROS, vyvinul náš organizmus mechanizmy zodpovedné za reguláciu príjmu, distribúcie a vylučovanie medi [40].

3.2.4 Dedičné ochorenia

V dôsledku vrodeného poškodenia génov kódujúcich transportérov medi sprostredkujúcich absorpciu alebo vylučovanie medi z organizmu dochádza k vzniku Menkesovej a Wilsonovej choroby.

Menkesova choroba

Patrí medzi multisystémové ochorenie, ktorého príčinou vzniku je mutácia v gène kódujúcom membránový proteín ATP7A, a tým dochádza k poruche metabolizmu medi. ATP7A patrí medzi transportéry ATP-ázy typu P a podieľa sa pri dodávaní medi do enzýmov a taktiež pri vylučovaní nadbytočnej medi z bunky [41].

ATP7A sa nachádza v rôznych bunkách tela a zlyhaním jej funkcie v enterocytoch dochádza k zníženiu absorpcie medi z potravy do krvného obehu, čo má za následok celkový nedostatok medi v organizme a zvýšené hromadenie medi v črevách. To sa následne prejavuje poškodením mozgu, mentálnou retardáciou, hypotóniou, poruchou spojivového tkaniva, aneuryzmou aorty a inými prejavmi nedostatku medi [42].

MD postihuje asi 1 zo 100 000 až 250 000 narodených detí a keďže ide o X-viazané dedičné ochorenie, bude týmto ochorením trpieť hlavne mužská populácia [43].

Medzi prvé príznaky ochorenia patria riedke vlasy bez lesku, bledá a suchá pokožka a aj spomalený vývoj dieťaťa. Taktiež sa môže objaviť hnačka, zvracanie a ospalosť. Tieto príznaky sú nevýrazné a preto najčastejšie dochádza k diagnostikovaniu ochorenia až medzi tretím a šiestym mesiacom života dieťaťa. Medzi oneskorené príznaky DM patrí slepota a problémy s dýchaním [41].

Ide o smrteľné ochorenie, ktoré má rôzne fenotypy. Pacienti s klasickou strednou až ťažkou formou MD väčšinou zomierajú do tretieho roka života na infekciu alebo degeneráciu neurónov. Avšak existuje miernejšia forma ochorenia, pri ktorej je zachovalá určitá funkcia ATP7A, nazývaná syndróm okcipitálneho rohu (OHS) [41].

Po narodení sa u dieťaťa trpiacim na OHS objavujú nešpecifické príznaky ako hnačka, časté močové infekcie a žltáčka, čo má za následok, že sa ochorenie najčastejšie diagnostikuje až vo veku 5 – 10 rokov. Medzi oneskorené komplikácie patrí výskyt krčových žíl, aneurizmy a ortostatickej hypotenzie. OHS sa od iných foriem MD líši výskytom okcipitálnych rohov a pacienti sa dožívajú aj 50 rokov [41].

Využívame hlavne symptomatickú liečbu a cieľom je predĺžiť a zvýšiť kvalitu života pacienta. V dôsledku ochorenia dochádza k zníženým hladinám medi v tkanivách, preto je dôležité podávať chýbajúcu meď buď subkutánne alebo parenterálne. Perorálne sa meď nepodáva, pretože je následne zachytávaná v črevách, a tým pádom nedôjde k jej absorpcii. Medzi najúčinnějšíu a najčastejšie používanú zlúčeninu medi patrí meď s histidínom. Pozitívne výsledky liečby závisia najmä od včasného začatia liečby a od čiastočne funkčného transportéra ATP7A [41].

Wilsonova choroba

Je to dedičné ochorenie, pri ktorom dochádza k poruche metabolizmu medi, podobne ako u Menkesovej chorobe. Rozdiely medzi nimi sú v type zmutovaného transportéra a v lepšej prognóze WD pri včasnej diagnóze a následnej liečbe. WD je spôsobená mutáciou génu kódujúcom transportér medi ATP7B, ktorý využívame na odstránenie nadmerného množstva medi z buniek. Preto pri poškodení jeho funkcie dochádza v organizme k hromadeniu medi, a to najmä v pečeni a v mozgu [44].

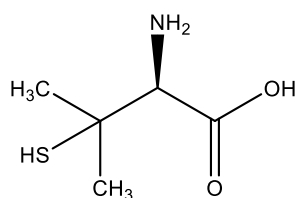
Prvé príznaky ochorenia súvisia s toxickým pôsobením medi na bunky v pečeni a v mozgu. Medzi symptómy spojené s pečeňou radíme slabosť, opuch nôh a ascites. Symptómy súvisiace s mozgom sa prejavujú zmenou osobnosti, svalovou stuhnutosťou, problémom s rozprávaním, úzkosťou a halucináciami. Pre WD je charakteristické aj ukladanie medi v rohovke, čo sa prejaví ako Kayser-Fleischerov prsteneček [45].

U detí začne asymptomatické obdobie ochorenia až medzi 8. až 18. rokom života - prejavuje sa pečeňovými komplikáciami. Neurologické prejavy sa začnú objavovať až po pár rokov od pečeňových [46].

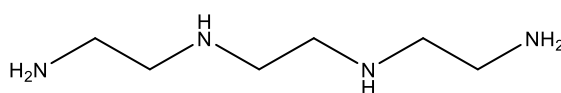
Medzi významný, ale nie bežne dostupný diagnostický test dokazujúci WD, patrí intravenózný test rádiomediálnej záťaže, ktorým zisťujeme zlyhanie inkorporácie medi do ceruloplazmínu. Taktiež užitočným testom môže byť D-penicilamínový provokačný test, ktorý sa využíva na diagnostiku najmä u detí. V súčasnosti sa do popredia dostávajú genetické testy, ktoré sú schopné identifikovať jedinca trpiaceho WD aj behom asymptomatického obdobia, čo priaznivo ovplyvňuje prognózu onemocnenia [46].

Neliečená WD spôsobuje smrť pacienta, a preto je dôležitá včasná diagnostika. Na diagnostiku sa využívajú okrem biopsie pečene aj krvné testy a testy moču, kde sledujeme znížené hladiny sérového ceruloplazmínu a zvýšené vylučovanie medi močom. Avšak nie vždy zmena týchto hladín znamená, že pacient trpí Wilsonovou chorobou. Asi u 50 % pacientov dochádza na základe WD k ochoreniu pečene, ako napríklad chronická hepatitída, cirhóza a akútne zlyhanie pečene [47].

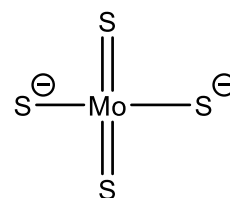
Po zistení, že jedinec trpí WD, musíme začať s chelatačnou terapiou medi s D-penicilamínom, trientínom alebo tetrathiomolybdenátom, ktorých účinky sa prejavajú až po 6 mesiacoch užívania. Kvôli nízkemu výskytu vedľajších účinkov sa najčastejšie využíva pri terapii trientín, ktorý zvyšuje vylučovanie medi z organizmu. D-penicilamín sa uprednostňuje podávať počas tehotenstva, pretože nepôsobí na plod toxicky. Dôležité je tiež odporučiť pacientovi, aby znížil príjem medi v potravinách a vylúčil huby, čokoládu, sušené ovocie a mäkkýše [45]. Taktiež môžeme pri liečbe využívať perorálne podávanie zinku, ktorý nielenže súťaží s meďou o absorpciu v zažívacom trakte, ale podporuje aj tvorbu endogénneho chelátoru medi v enterocytoch, nazývaného metalothioneín, ktorý bráni vstrebávaniu medi do obehu [32].



D-penicilamín



Trientín



Tetrathiomolybdenát

Obr. 3. ŠTRUKTÚRY LIEČIV POUŽÍVANÝCH PRI TERAPII WILSONOVEJ CHOROBY.

3.2.5 Neurodegeneratívne ochorenia

Meď je dôležitý pre správny vývoj a funkciu mozgu, pretože ako kofaktor množstva enzýmov prispieva napríklad k syntéze katecholamínov, aktivácii neuropeptidov a hormónov, a tiež chráni mozog pred škodlivými vplyvmi ROS. Obsah medi v mozgu je prísne regulovaný, pretože zmeny jeho koncentrácie vedú k vzniku neurodegeneratívnych ochorení [25].

Parkinsonova choroba (PD)

PD patrí medzi druhé najčastejšie sa vyskytujúce neurodegeneratívne ochorenie prejavujúce sa hlavne týmito symptómami: tras v pokoji, svalová stuhnutosť, spomalené pohyby nazývané bradykinéza a akinéza a aj zmeny v držaní tela. Okrem zmien pohybových schopností pacienta je ochorenie spojené aj s autonómnou dysfunkciou, kognitívnou abnormalitou, poruchou spánku, poruchami nálady a bolesťou. Nástup ochorenia sa v priemere pohybuje okolo veku 55 rokov [48].

Hlavnými znakmi ochorenia je strata dopaminergných neurónov v substantia nigra a taktiež výskyt vláknitých agregátov v Lewyho telieskach, ktoré vznikajú premenou rozpustného proteínu α -synukleínu [49].

Asi 5-10 % pacientov trpí ochorením v dôsledku genetickej predispozície a u zvyšných pacientov je rizikovým faktorom hlavne vek a vplyv prostredia. Aj keď patogenéza ochorenia nebola úplne objasnená, predpokladá sa zásadný vplyv oxidačného stresu a mitochondriálnej dysfunkcie [50].

Niektoré štúdie tvrdia, že zvýšená hladina medi spôsobuje riziko vzniku PD, ale táto teória ešte nie je úplne objasnená. Niektoré štúdie naopak tvrdia, že skôr nízke hladiny medi vedú k vzniku ochorenia. U pacientov s PD bola zistená nižšia koncentrácia medi a ceruloplazmínu v krvi v porovnaní so zdravým jedincom rovnakého veku. A taktiež sa dokázali aj znížené hladiny medi v oblasti mozgu substantia nigra u pacienta s PD [34].

Jedným z dôvodov, prečo sa predpokladá, že sa meď podieľa na patogenéze PD, je práve jej oxidačno-redukčná vlastnosť, vďaka ktorej dokáže tvoriť ROS, a tým zvyšovať oxidačný stres. Ďalšie analýzy poukazujú na schopnosť α -synukleínu viazať meď, čím dochádza k jeho konformačnej zmene, a to podporuje jeho fibriláciu a agregáciu za vzniku Lewyho teliesok. Taktiež štúdie *in vitro* dokázali, že meď podporuje oxidáciu dopamínu, čím sa vytvárajú produkty poškodzujúce DNA [48].

Jednou z možností liečby vysokých hladín medi u pacienta s PD sa predpokladalo podávanie špecifických chelátorov, ktoré dokážu prejsť cez hematoencefalickú bariéru. Výsledky pokusov u myši pri podávaní chelátorov D-penicilamínu a dietylditiokarbamátu boli však neuspokojivé, pretože viedli k vzniku neurotoxicity [34].

Alzheimerova choroba (AD)

AD je typ demencie, ktorá zhoršuje behaviorálne a kognitívne funkcie a najčastejšie sa vyskytuje u ľudí nad 65 rokov. Asi u 10 % ľudí sa môže ochorenie prejavíť aj skôr, ale tento jav je nezvyčajný. Ochorenie sa prejavuje najmä zhoršením pamäti, jazyka, porozumenia, uvažovania a úsudku [51].

AD radíme medzi progresívne neurodegeneratívne ochorenie, ktorého príčinou vzniku je výskyt extracelulárnych plakov zložených z prirodzene sa vyskytujúceho β -amyloidného peptidu, ktoré bránia neurónom prenášať impulzy a z intracelulárnych neurofibrilárnych klobiek. Na zmiernenie symptómov sa podávajú pacientom inhibítory acetylcholinesterázy a antagonista receptora N-metyl-D-aspartátu. Avšak ani ich podávaním nedokážeme zabrániť postupnej strate neurónov a atrofii mozgu [52].

V amyloidných plakoch sa zistila prítomnosť nielen β -amyloidu, ale aj vysoká koncentrácia kovových iónov, ako sú meď, zinok a železo. Dôležité je hlavne znížiť množstvo medi viazanej na β -amyloid, pretože po väzbe Cu^{2+} iónov došlo k zmene podielu β -listu a α -helixu v jeho štruktúre, čo viedlo k jeho agregácii. Taktiež sa zistilo, že zvýšená koncentrácia Cu^{2+} iónov v komplexe s β -amyloidom v prítomnosti redukčných činidiel viedla k tvorbe hydroxylových radikálov pôsobiacich toxicky na neuróny [53].

Predpokladalo sa, že jednou z možností ako liečiť AD je eliminovať Cu^{2+} ióny podávaním chelátorov medi, avšak výsledky poukázali, že podávanie chelátorov medi môže predísť ochoreniu, ale nedokáže ho vyliečiť [53].

3.2.6 Ostatné ochorenia

Zmeny homeostázy medi sa podieľajú nielen pri vzniku iných ochorení, ale môžu ovplyvňovať aj priebeh ochorenia. Bolo dokázané, že nízke hladiny medi môžu súvisieť s vyšším rizikom vzniku kardiovaskulárnych ochorení, pretože meď podporuje tvorbu a dozrievanie ciev, čo vedie k angiogenéze a vaskularizácii. Novšie štúdie ukázali, že vekom sa koncentrácia medi znižuje v aorte a v koronárnych artériách, následkom čoho dochádza

v myokarde k zmenám v štruktúrnych, funkčných a biochemických dráhach, čo sa prejavuje srdcovou hypertrofiou vedúcou k zlyhaniu srdca [54].

Taktiež nedostatočná hladina medi u ľudí vedie k zníženým hladinám medených enzýmov, ako je SOD, ktorý má antioxidačné vlastnosti, čím zabraňuje oxidácii lipoproteínov s nízkou ale aj s vysokou hustotou, čo zohráva dôležitú úlohu pri vzniku aterosklerózy. Nedostatok medi sa taktiež podieľa na zvyšovaní celkového cholesterolu, preto sa týmto pacientom podáva chýbajúca meď vo forme potravinových doplnkov. Avšak vysoké hladiny iónov medi práve naopak vedú k tvorbe voľných radikálov, ktoré spôsobujú oxidáciu týchto lipoproteínov, preto je dôležité udržiavať homeostázu medi [55].

Zvýšená koncentrácia iónov medi v plazme sa nachádza aj u pacientov s diabetom, čím sa dokázalo, že zvýšený oxidačný stres spôsobuje rozvoj a progresiu tohto ochorenia. Vďaka redoxným vlastnostiam medi dochádza k tvorbe voľných radikálov, ktoré spôsobujú poškodenie DNA a peroxidáciu lipidov s následnou bunkovou smrťou. Použitím chelátora medi trientínu znižujeme riziko srdcového zlyhania ako následok diabetu. Ďalšou možnosťou je podávanie perorálneho antidiabetika metformínu schopného chelatovať prechodné kovy, ako je meď, a tým znižovať vaskulárne riziko [56].

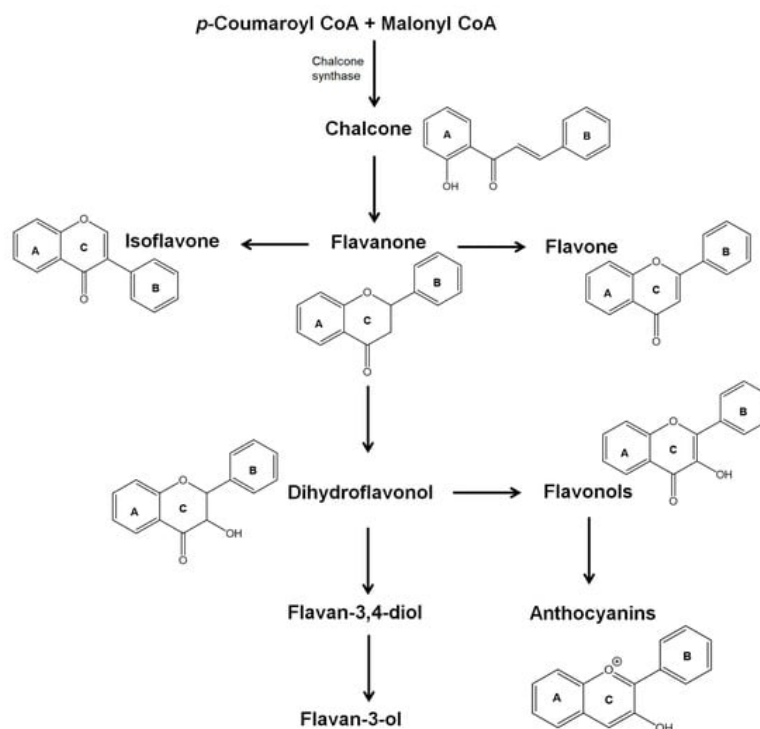
Ďalším ochorením, ktoré významne ovplyvňuje koncentráciu medi v sére, je aceruloplazminémia. Patrí medzi autozomálne recesívne ochorenia a prejavuje sa nízkou alebo úplnou stratou aktivity ceruloplazmínu, čo má za následok zvýšené ukladanie železa v mozgu a vo vnútornostiach a taktiež spôsobuje nízke koncentrácie medi v sére. Medzi hlavné symptómy ochorenia patrí degenerácia rohovky, cukrovka, anémia a neurologické poruchy, ako napr. ataxia. Pri terapii podávame pacientom liečiva desferioxamín, deferiprón a deferasirox, ktoré sú schopné chelatovať železo, a tým znižovať jeho koncentráciu v sére, mozgu a v pečeni. Taktiež majú pozitívny účinok pri spomalení progresie neurologických príznakov [57].

3.3 Flavonoidy

3.3.1 Biosyntéza flavonoidov

Biosyntéza flavonoidov začína fenylpropanoidovou cestou, ktorá je umožnená prítomnosťou aromatickej aminokyseliny fenylalanínu syntetizovaného šikimátovou cestou. Pri prvom kroku sa fenylalanín mení deamináciou na kyselinu *trans*-škoricovú vďaka prítomnosti enzýmu fenylalanín-amónnej lyázy. V druhom kroku dochádza pomocou hydroxylácie k premene kyseliny *trans*-škoricovej na kyselinu *p*-kumarovu. Tento krok je umožnený katalytickou aktivitou 4-hydroxylázy kyseliny škoricovej. V treťom kroku umožňuje pridať koenzým A (CoA) ku kyseline *p*-kumarovej prítomnosť enzýmu 4-kumarát-CoA ligázy za vzniku *p*-kumaroyl-CoA [58].

Prítomnosť *p*-kumaroyl-CoA tvoreného fenylpropanoidovou cestou a malonyl-CoA syntetizovaného acetátovou cestou v rastlinách umožňuje vznik 15-uhlíkového základného skeletu flavonoidov. Pomocou enzýmu chalkónsyntázy dochádza ku kondenzácii troch molekúl malonyl-CoA s jednou molekulou *p*-kumaroyl-CoA na medziprodukt chalkón, ktorý sa následne mení na flavanóny zložené z dvoch benzénových kruhov a jedného 6-členného heterocyklického kruhu. Vznik týchto flavanónov následne umožňuje syntézu ostatných podskupín flavonoidov [59].



Obr. 4. PRIEBEH SYNTÉZY JEDNOTLIVÝCH PODSKUPÍN FLAVONOIDOV [60].

3.3.2 Vlastnosti flavonoidov

Flavonoidy patria medzi sekundárne rastlinné metabolity s fenolickou štruktúrou, ktoré sú izolované z cievnatých rastlín. Poznáme viac ako 10 000 druhov zlúčenín nachádzajúcich sa nielen v rôznych častiach rastlín, ale aj v ovocí a v zelenine. Taktiež sa nachádzajú v nápojoch rastlinného pôvodu, ako je čaj a víno. V rastlinách majú jedinečné vlastnosti, ktoré ju chránia proti oxidačnému stresu, ovplyvňujú farbu kvetov a plodov, pôsobia taktiež fotoprotektívne, majú antimikrobiálne účinky a napomáhajú rastline prispôbiť sa vonkajším podmienkam, ako je teplo a mráz [61, 62].

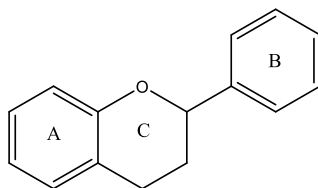
V súčasnosti sa radia medzi dôležitú zložku v nutričných, farmaceutických a kozmetických prípravkoch pre ich predpokladané antioxidačné, antimikrobiálne, protizápalové, neuroprotektívne, antikarcinogénne a protivírusové účinky a taktiež majú schopnosť ovplyvňovať bunkové enzýmy. Taktiež sa predpokladá ich kardioprotektívny účinok, pre ich schopnosť inhibovať peroxidáciu lipidov a chelatovať redox-aktívne kovy. Ich biologická aktivita sa odvíja od typu štruktúry a od biologickej dostupnosti [62].

3.3.3 Základná štruktúra flavonoidov

Flavonoidy sú nízkomolekulárne látky, ktorých základná štruktúra je C₆–C₃–C₆ s výnimkou stilbénov so štruktúrou C₆–C₂–C₆. Flavonoidy delíme do rôznych podskupín nielen na základe stupňa nasýtenia heterocyklického kruhu C, ale aj podľa polohy kruhu B. Vplyv na delenie má aj prítomnosť substituentov, ako sú alkyl, metoxy- a hydroxyskupiny na benzénovom kruhu A a B. Tieto podskupiny nazývame chalkóny, stilbény, auróny, flavanóny, flavóny, izoflavóny, flobafény, dihydroflavonoly, flavonoly a antokyány. Ich dostupnosť v rastlinách je variabilná a ovplyvňujú ju podmienky prostredia, výskyt hormónov a fyzické poranenie [58, 60].

Flavonoidy sa v prírode nachádzajú buď vo forme aglykónov, glykozidov alebo metylovaných derivátov. Ich voľná forma s lipofilnými vlastnosťami sa nazývaná aglykón a kvôli jeho nestabilite, reaktívnosti a nízkej rozpustnosti existuje v glykozylovanej forme, ktorá vzniká naviazaním jedného alebo viacerých cukorných jednotiek, ako sú napríklad monosacharidy glukóza, rhamnóza, galaktóza, arabinóza a xylóza na fenolové alebo hydroxylové skupiny. Následkom glykozylácie zvyšujeme hydrofilitu a stabilitu štruktúry flavonoidov. Taktiež konjugáciou flavonoidových aglykónov a glykozylových skupín meníme

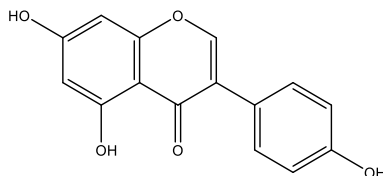
ich biologickú dostupnosť, znižujeme toxicitu a výskyt nežiaducich účinkov a zvyšujeme špecifickosť účinku [63].



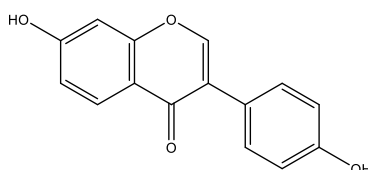
Obr. 5. ZÁKLADNA ŠTRUKTÚRA FLAVONOIDOV. Skladá sa z 15-uhlíkového flavónového skeletu zloženého z dvoch benzénových kruhov označených písmenom A a B, ktoré sú spojené s pyránovým kruhom C, ktorý obsahuje kyslík [59, 60].

3.3.4 Podskupiny flavonoidov

Izoflavóny sú významnou podskupinou flavonoidov, ktoré majú na rozdiel od základnej štruktúry flavonoidov kruh B viazaný v polohe 3. Ich štruktúra sa podobá hormónu 17- β -estradiolu a preto majú izoflavóny nízku afinitu k estrogénym receptorom. V strukovinách sú vo forme glykozidov napríklad genistín a daidzeín, ktoré sa zle vstrebávajú z tenkého čreva, a preto sa pôsobením črevných baktérii hydrolyzujú na biologicky aktívne aglykóny nazývané genisteín a daidzeín (Obr. 6, 7). Ich hlavným zdrojom je sója a aj potraviny získané zo sóje [64].



Obr. 6. ŠTRUKTÚRA GENISTEÍNU

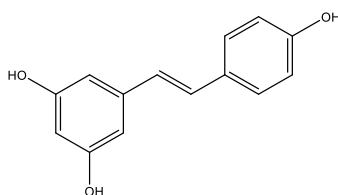


Obr. 7. ŠTRUKTÚRA DAIDZEÍNU

Stilbény niekedy radíme medzi flavonoidy, pretože sú syntetizované taktiež z fenylypropanoidovej cesty, ale ich základná štruktúra obsahuje len 14 uhlíkov. Skladá sa z dvoch benzénových kruhov spojených etylénovým mostíkom a kvôli prítomnosti dvojitej väzby existuje v *cis* a *trans* izomérskej forme [65].

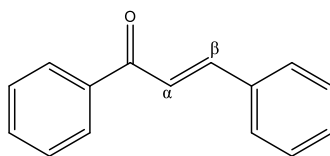
Nachádzajú sa len v niektorých čeľadiach, ako sú Vitaceae, Pinaceae, Fabaceae a Polygonaceae, pretože obsahujú enzým stilbensyntázu. Pôsobia primárne ako fytoalexíny, čo sú látky, ktoré syntetizuje rastlina proti vonkajším stresom, ako sú patogénne infekcie, vysoké teploty a oxidácia [66].

Najznámejším zástupcom stilbenov je resveratrol (Obr. 8), ktorý bol v minulosti vo veľkom skúmaný pre svoje široké spektrum pozitívnych biologických účinkov. Povest' resveratrolu avšak utrpela, keď sa zistilo, že veľké množstvo článkov bolo klamlivých a následne stiahnutých [67].



Obr. 8. ŠTRUKTÚRA RESVERATROLU

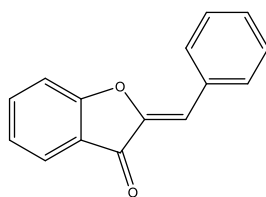
Chalkóny sú prekurzory flavonoidov a izoflavonoidov, ktoré sa vo všeobecnosti radia medzi α , β -nenасыtené ketóny a ich základná štruktúra pozostáva z dvoch benzénových kruhov spojených 3-uhlíkovým alkénovým mostíkom. Majú nízku molekulovú hmotnosť a vysokú lipofilitu a kvôli výskytu chromofóru $-CO-CH=CH-$ v štruktúre patria medzi farebné zlúčeniny, existujúce v *trans* alebo *cis* izomérskej forme. Sú to biologicky aktívne molekuly vykazujúce antidiabetické, protizápalové, antimikrobiálne, antioxidačné a antiparazitické účinky [68].



Obr. 9. ZÁKLADNÁ ŠTRUKTÚRA CHALKÓNOV

Auróny sa vyskytujú v prírode v menšom množstve ako ostatné podtriedy flavonoidov napríklad v čeľadiach Asteraceae, Fabaceae, Moraceae, Rubiaceae a Rosaceae ale aj v niektorých druhov machorastov. Ich výskyt sa prejavuje žiarivou žltou farbou, pretože patria medzi pigmenty nachádzajúce sa hlavne v okvetných lístkoch a listoch [69].

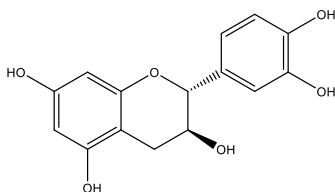
Získavame ich z 2'-hydroxychalkónov pôsobením enzýmu aurónsyntázy a ich štruktúra pozostáva z benzofuránového heterocyklického kruhu, na ktorom je naviazaná fenylová skupina cez exocyklickú dvojitú väzbu. Medzi ich významne vlastnosti radíme protizápalové, antimikrobiálne a antikarcinogénne účinky [70].



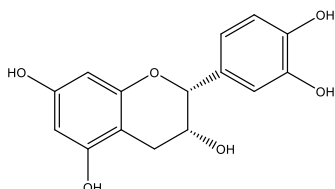
Obr. 10. VŠEOBECNÁ ŠTRUKTÚRA AURÓNOV

Flavanoly sú jednou z najrozšírenejších podtried flavonoidov, ktoré majú množstvo zlúčenín líšiacich sa prítomnosťou hydroxylových skupín a majú tiež dve chirálne centrá na C2 a C3, čo znamená, že vytvárajú 4 izoméry. Jednotlivé flavanoly delíme od jednoduchých monomérov, ako je napr. katechín (Obr. 11) a jeho izomér epikatechín (Obr. 12) po oligoméry až polyméry nazývané proantokyanidíny, ktoré majú ďalší chirálny uhlík na C4 [71].

Absorpcia flavanolov v tenkom čreve je ovplyvnená koncentráciou zlúčeniny v potrave, zložením črevnej mikroflóry a stupňom polymerizácie. Príjmom týchto látok by sme mohli predchádzať kardiovaskulárnym (KVS) ochoreniam a rakovine, ale ich biologická dostupnosť u ľudí je menšia ako 4 % [72].

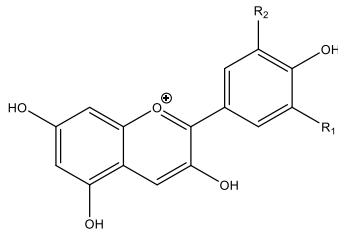


Obr. 11. ŠTRUKTÚRA KATECHÍNU



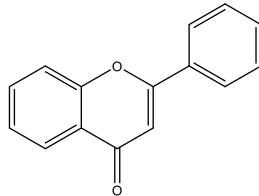
Obr. 12. ŠTRUKTÚRA EPIKATECHÍNU

Antokyány sú prírodné pigmenty nachádzajú sa v rastlinách, kde sú zodpovedné za modré, fialové a červené zafarbenie kvetov, ovocia a hľúz. Vznikajú z aglykónu antokyanidínu (Obr. 13), ktorý je modifikovaný cukrami za vzniku glykozidov alebo acylovými kyselinami. Vo svojej štruktúre majú na atóme kyslíka kladný náboj, ktorý nazývame tiež ako flavyliový ión. Podľa polohy a počtu hydroxylových a metoxylových skupín rozpoznávame rôzne druhy antokyánov, ktorých stabilita závisí od teploty, pH, svetla a štruktúry. Používame ich nielen ako potravinárske farbivá, ale taktiež majú antidiabetické, protizápalové, antikarcinogénne účinky a tiež napomáhajú predchádzať KVS ochoreniam a obezite [73].



Obr. 13. AGLYKÓN ANTOKYANIDÍN

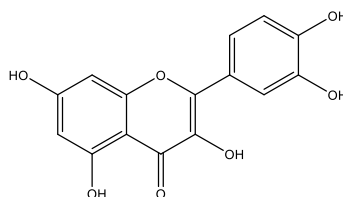
Flavóny patria medzi jednu z najväčších podskupín flavonoidov, ktoré majú v základnom skelete flavonoidov navyše dvojitú väzbu medzi C2 a C3 a v polohe C4 sú oxidované. Vyskytujú sa v rastlinách ako pigmenty dodávajúce kvetom biele až krémové zafarbenie a tiež pôsobia ako ochranné látky pred UV žiarením a hmyzom. Ich štruktúra pozostáva z aglykónu a z cukrovej jednotky, ktorá je pripojená buď cez hydroxylové skupiny a nazývame ich *O*-glykozidy alebo *C*-glykozidy, ak je priamo viazaná na uhlík [74].



Obr. 14. ZÁKLADNÁ ŠTRUKTÚRA FLAVÓNOV

Flavonoly patria medzi najrozšírenejšie flavonoidy odvodené od 3-hydroxyflavónu, ktoré sa vyskytujú takmer vo všetkých druhov ovocia a zeleniny ale najmä v cibuli, jablkách, hrozne, víne a v čaji. Ich denný príjem sa pohybuje okolo 20 – 35 mg/deň a z toho najväčšiu časť tvorí kvercetín (Obr. 15) a jeho glykozidy. Kvercetín sa využíva najmä pre svoje antihypertenzívne, antioxidantné a kardioprotektívne účinky a taktiež bráni vzniku cievnych ochorení [75].

Bolo zistené, že voľné formy flavanolov majú nízku biologickú dostupnosť po perorálnom podaní, ktorá je asi 2–4 % kvôli ich rozsiahlemu metabolizmu a rýchlemu vylúčeniu z tela. Avšak ich glykozylované formy majú lepšiu absorpciu, ktorá sa pohybuje okolo 3–17 % a je ovplyvnená typom a rozpustnosťou naviazaných cukrov [63].



Obr. 15. ŠTRUKTÚRA KVERCETÍNU

3.3.5 Metabolizmus flavonoidov

Flavonoidy sa spracovávajú na absorbovateľnú formu metabolizmom fázy I a II, ktoré prebiehajú v gastrointestinálnom trakte a v pečeni a tiež pôsobením mikroflóry v hrubom čreve. Tieto procesy sú ovplyvnené štruktúrou flavonoidov, ale taktiež aj vekom, pohlavím a genotypom jedinca [76].

Biologická dostupnosť flavonoidov prijímaných potravou závisí od ich farmakokinetických vlastnostiach v organizme, ako je absorpcia, distribúcia, metabolizmus a vylučovanie. Tieto vlastnosti sa líšia v jednotlivých podskupinách flavonoidov z dôvodu ich rozmanitej štruktúry. Zistilo sa však, že pri perorálnom podávaní je ich absorpcia asi len 10 % z celkového množstva prijímaných flavonoidových glykozidov [77].

Dôležitými faktormi, ktoré ovplyvňujú vstrebávanie je štruktúra flavonoidov, pretože v rastlinách sa nachádzajú najmä vo forme glykozidov, ktoré sú ťažšie absorbovateľné, a preto sa musia najprv v tenkom čreve pôsobením enzýmov metabolizovať na ľahšie vstrebateľné aglykóny. Taktiež aj zloženie črevnej mikroflóry má zásadný význam pri ich absorpcii [78].

Pri absorpcii glykozidov do pečene sa využívajú dva spôsoby. Prvým je odštiepenie cukornej jednotky z glykozidu v tenkom čreve pôsobením enzýmu laktáza-florizin hydroláza, ktorá umožňuje hydrolyzovať laktózu na monosacharidy glukózu a galaktózu. Takto vytvorený aglykón je následne prenášaný do enterocytov pomocou pasívnej difúzie, ktorá vznikla v dôsledku zvýšenej lipofility. Výnimočne môžu byť aj samotné glykozidy prenášané do enterocytov pomocou sodík-dependentného transportéra glukózy, kde sú následne hydrolyzované na aglykóny pôsobením cytosolických β -glukozidáz [76].

Ostatné flavonoidy, ktoré nie sú substrátmi týchto enzýmov, a teda ich nemôžeme absorbovať, pokračujú do hrubého čreva, kde pôsobením baktérii môžu byť deglykosylované na absorbovateľné aglykóny alebo sa degradujú na biologicky dostupné molekuly, ako sú fenolové a aromatické kyseliny [76, 79].

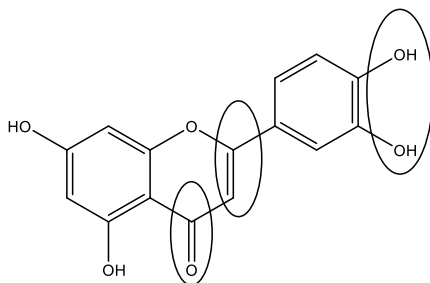
Následne takto získané aglykóny sú pomocou membránovo transportných proteínov ATP prenášané cez bazolaterálnu membránu do portálnej žily, alebo sú transportované naspäť do lúmena čreva, čím dochádza k zníženiu ich biologickej dostupnosti. Po absorpcii aglykónov do pečene sa pôsobením enzýmov uridín-5'-difosfát-glukuronozyltransferázy, sulfotransferázy a katechol-*O*-metyltransferázy menia na konjugované metabolity. V plazme sa väčšinou nachádzajú len konjugované formy, najmä glukuronidy prípadne môžeme nájsť aj aglykóny

v nízkych koncentráciách. Takto vytvorené flavonoidové metabolity vylučujeme z organizmu najmä močom, prípadne žľouchou, pri ktorej avšak dochádza k čiastočnému vstrebávaniu flavonoidov naspäť do tenkého čreva [76].

3.3.6 Antioxidačná aktivita flavonoidov

Flavonoidy sú tradične známe pre svoje antioxidačné pôsobenie, avšak ich spektrum účinku je značne rozsiahlejšie. Poznáme niekoľko mechanizmov, ktoré využívajú flavonoidy na potlačenie vzniku oxidačného stresu. Prvým je ich schopnosť vychytávať ROS prostredníctvom svojej štruktúry. Taktiež môžu chelatovať voľné ióny prechodných prvkov, ako je napríklad železo a meď a tým sa podieľajú na zníženej tvorbe ROS, pretože blokujú priebeh Fentonovej reakcie. Môžu tiež inhibovať enzýmy, ktoré umožňujú tvorbu voľných radikálov ako sú napríklad xantínoxidáza, glutatión S-transferáza a mitochondriálna sukcinoxidáza, prípadne môžu zvýšiť tvorbu antioxidačných enzýmov v organizme a tým podporiť vychytávanie voľných radikálov [60].

Antioxidačná aktivita sa u jednotlivých flavonoidov líši na základe zmien hydroxylových skupín, ktorých poloha a počet priamo koreluje s antioxidačným účinkom. Ich prítomnosť na základnom skelete umožňuje darovať vodík voľným radikálom, čím dochádza k ich premene na menej reaktívne zlúčeniny. Predpokladá sa, že naviazaním aspoň dvoch hydroxylových skupín v kruhu B výrazne zlepšuje antioxidačnú aktivitu. Taktiež naviazaním hydroxylovej skupiny na kruh A v polohe 5 a 7 vieme podporiť vychytávanie radikálov. Ďalšou možnosťou ako môžeme podporiť antioxidačný účinok je prítomnosťou dvojitej väzby medzi C2 a C3 v kombinácii s karbonylovou skupinou v polohe 4 a taktiež vo forme aglykónov majú flavonoidy lepšiu aktivitu proti radikálom [80].



Obr. 16. OBMENA ŠTRUKTÚRY FLAVONOIDOV OVPLYVŇUJÚCA ICH ANTIOXIDAČNÚ AKTIVITU

Niektoré flavonoidy, ako napríklad kaempferol, rutín a kvercetín, sú schopné chelatovať redoxne aktívne ióny Cu^{2+} a Fe^{2+} , a tým predchádzať tvorbe voľných radikálov.

Tento účinok je umožnený prítomnosťou chelatačného miesta v ich štruktúre, ktoré je tvorené z *o*-dihydroxylových skupín v kruhu B alebo A, 3-hydroxy-4-ketoskupín kruhu C alebo prítomnosťou 5-hydroxy-4-keto skupín v kruhu A a C [81].

3.3.7 Pro-oxidačná aktivita flavonoidov

Flavonoidy môžu rovnako ako aj iné antioxidanty za určitých okolností pôsobiť ako pro-oxidanty, čo znamená, že sú schopné podporovať oxidáciu ostatných zlúčenín. Tieto účinky sa môžu prejaviť v *in vivo* podmienkach, keď sa do oxidačných procesov zapoja voľné ióny prechodných kovov. Flavonoidy majú totiž mimo chelatačnej schopnosti, taktiež redukčnú aktivitu. Redukujú Cu^{2+} na Cu^+ alebo Fe^{3+} na Fe^{2+} a tým umožňujú tvorbu iniciačných radikálov [82]. Mechanizmus prebieha podľa vyššie zmienenej Haber-Weissovej a Fentonovej reakcie (Reakcia 1 a 2).

Ich pro-oxidačná aktivita sa prejavuje počas vychytávania ROS, kedy dochádza k vzniku flavonoidových fenoxyllových radikálov, ktoré sú vysoko reaktívne a v prítomnosti vysokých hladín prechodných kovov podliehajú ďalšej oxidácii, pričom vznikajú okrem flavonoidových chinónov aj škodlivé superoxidové radikály. Tieto škodlivé radikály vznikajú aj oxidáciou NADH pôsobením flavonoidových fenoxyllových radikálov. Existuje predpoklad, že pro-oxidačná aktivita flavonoidov vychádza z ich štruktúry, konkrétne na základe vyššieho počtu hydroxylových skupín, najmä v kruhu B, prítomnosťou dvojitej väzby v polohe 2 a 3 a tiež prítomnej oxoskupiny na C4 [82].

V zdravom ľudskom tele sú kovové ióny z veľkej časti sekvestrované vo formách neschopných katalyzovať reakcie voľných radikálov (napr. v ceruloplasmine) [82]. Pri poškodení tkaniva môže však dôjsť k uvoľneniu voľných kovových iónov, napr. v aterosklerotických léziách alebo po ischemicko-reperfúznom poškodení, kedy boli v krvnom obehu namerané katalyticky aktívne ióny železa a medi. Práve v týchto prípadoch sa môže prejaviť pro-oxidačná aktivita flavonoidov [83, 84].

To či budú mať flavonoidy antioxidantné alebo pro-oxidačné pôsobenie závisí na mnohých faktoroch. Dôležitá je tiež hodnota pH, ktorá sa však pri patologických stavoch, ako je napr. akútny infarkt myokardu znižuje a tým dochádza k zvýšeniu hladiny voľných kovových iónov a následne sa tak zvyšuje pravdepodobnosť pro-oxidačného pôsobenia. Obdobné poruchy homeostázy prechodných kovov sa objavujú pri neurodegeneratívnych onemocneniach, zápale, tumoroch alebo cukrovke [85, 86].

3.3.8 Ďalšie účinky flavonoidov na ľudské zdravie

Flavonoidy, ktoré prijímame v potrave majú okrem už spomenutého antioxidačného účinku aj iné významné účinky, ktoré majú pozitívny vplyv na zdravie jedincov. Radíme sem okrem nižšie spomenutých aj napríklad antivírusový, imunomodulačný, antidiabetický, protirakovinový a neuroprotektívny účinok [80].

Kardioprotektívny účinok

Flavonoidy sú schopné odstraňovať reaktívne formy kyslíka aj dusíka, ktoré sú zodpovedné za oxidačnú modifikáciu LDL. Týmto mechanizmom dochádza k vzniku aterosklerózy, ktorá je zodpovedná za rozvoj KVS ochorení, ako sú infarkt myokardu, embólie a iné. Medzi významné flavonoidy s antioxidačnou schopnosťou patria kvercetín a jeho glykozidy. Okrem toho kvercetín je schopný znižovať nielen LDL v krvi, ale taktiež pozitívne ovplyvňuje systolický krvný tlak [87].

Ďalšou možnosťou, ako dokážu flavonoidy chrániť srdce pred poškodením, je ich vazodilatačná funkcia, ktorá bola dokázaná u kvercetínu, naringenínu a hesperetínu. U naringenínu boli dokázané aj antihypertenzívne účinky a taktiež podporuje relaxáciu hladkého svalstva ciev. Ďalším významným flavonoidom pri ochrane srdca je baikalín, ktorý znižuje apoptózu buniek v srdcovom tkanive a tým zlepšuje funkciu srdca. Niektoré flavonoidy, ako napríklad chryzín, dokážu vďaka prítomnosti hydroxylových skupín potlačiť agregáciu krvných doštičiek, čím znižujú riziko KVS ochorení. U antokyánov bol tiež dokázaný kardioprotektívny účinok kvôli ich pozitívnemu vplyvu na systolický krvný tlak ale aj na hladinu celkového a LDL cholesterolu [60].

Protizápalový účinok

Za normálnych okolností je zápal obranná reakcia organizmu, ktorá sa spúšťa pri rozvoji infekcie spôsobenej patogénom alebo pri poranení tkaniva. Súčasťou zápalu sú bunky imunitného systému, ktoré produkujú prozápalové cytokíny a chemokíny zodpovedné za imunitnú odpoveď. Avšak za určitých okolností sa môžu počas zápalovej reakcie tvoriť voľné radikály zodpovedné za poškodenie tkaniva a bunkovej proliferácii, čím dochádza k vzniku chronického zápalu [88].

Flavonoidy majú protizápalové účinky vďaka svojej schopnosti ovplyvňovať priebeh zápalovej reakcie. Dokážu inhibovať regulačné enzýmy ako sú proteínkináza a fosfodiesteráza, ktoré majú význam pri aktivácii buniek zápalovej reakcie. Taktiež ako silné antioxidanty dokážu odstraňovať voľné radikály odvodené od dusíka alebo kyslíka, a tým zabrániť vzniku oxidačného stresu. Flavonoidy tiež môžu ovplyvňovaním metabolizmu kyseliny arachidónovej znižovať tvorbu mediátorov, ako sú napríklad prostaglandíny a leukotrieny, ktoré sa podieľajú na vzniku zápalovej reakcie [88].

Antibakteriálny účinok

V súčasnosti dochádza k nárastu antimikrobiálnej rezistencie patogénov voči antibiotikám a z tohto dôvodu sa hľadajú nové rastlinné látky, ktoré sú pre ľudské telo netoxické a majú antibakteriálnu aktivitu. Jednou z týchto možností je podávanie niektorých podskupín flavonoidov, ktoré ovplyvňovaním rôznych antimikrobiálnych mechanizmov spôsobujú zneškodnenie patogénov v ľudskom tele [89].

Jedným z mechanizmov ako dokážu flavonoidy zabrániť rastu baktérii je inhibíciou syntézy bunkového obalu. Táto vlastnosť bola dokázaná u flavonolov ako je kvercetín, kempferol a tiež u flavónov. Katechíny dokážu interagovať s peptidoglykánovou vrstvou, čo vedie k potlačeniu biosyntézy bakteriálnej bunkovej steny. Ďalším mechanizmom je schopnosť flavonoidov inhibovať bakteriálne topoizomerázy, čo spôsobuje narušenie syntézy nukleových kyselín dôležitých pri bunkovom delení baktérii. Taktiež flavonoidy ako napríklad katechín, naringín a apigenín, sú schopné zabrániť adhézii baktérii na hostiteľskej bunke tým, že inhibujú syntézu polysacharidov na povrchu baktérii [89].

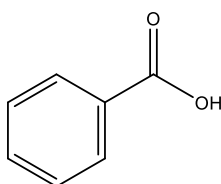
Antimykotický účinok

Niektoré flavonoidy môžu pôsobiť ako antimykotiká kvôli ich schopnosti ovplyvňovať životne dôležité mechanizmy prebiehajúce v bunkách húb. Napríklad izoflavón glabridín inhibuje syntézu proteínov β -glukánu a chitínu nachádzajúcich sa v bunkových stenách húb. Kvercetín inhibuje oxidatívnu fosforyláciu zodpovednú za dýchanie prebiehajúce v mitochondriách. Myricetín, kempferol, genisteín a ďalšie flavonoidy inhibujú syntézu DNA, RNA a proteínov dôležitých pre bunkové delenie [60].

3.4 Testované látky

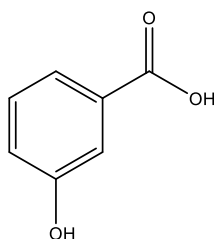
Z veľkého množstva polyfenolických látok boli pre túto prácu vybrané deriváty kyseliny benzoovej, ktoré sa v malom množstve môžu vyskytovať v rastlinách, prípadne vznikajú pri degradácii flavonoidov prijímaných potravou pôsobením mikroflóry hrubého čreva. Tieto malé fenolické látky boli vybrané preto, aby sa zistilo, ako reagujú metabolity flavonoidov s iónmi medi v organizme a či je možné, že za zdraviu prospešné účinky flavonoidov sú zodpovedné práve ich metabolity, ako už bolo v minulosti zmieňované.

Kyselina benzoová je aromatická jednosýtna karboxylová kyselina, ktorá sa prirodzene nachádza v rastlinách a v živočíšnych tkanivách, ako sú svaly a vnútornosti. Využíva sa pre svoje konzervačné účinky a tiež ako ochucovadlo v potravinách, kozmetike a vo farmaceutických výrobkoch. Taktiež sa zistilo, že kyselina benzoová dokáže interagovať s bunkovou membránou a po prenesení do bunky dochádza k jej disociácii vplyvom zásaditého pH za vzniku toxických iónov a tiež inhibuje enzýmy metabolických ciest, čím sa prejavuje jej antibakteriálny a antimykotický účinok [90].



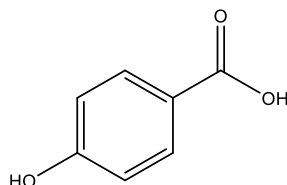
Obr. 17. KYSELINA BENZOOVÁ

Kyselina 3-hydroxybenzoová patrí medzi kyseliny, ktoré vedú pomocou svojich hydroxylových skupín zachytávať voľné radikály a tým potlačiť vznik oxidačného stresu a zápalu. Taktiež bol dokázaný ich aktivujúci účinok na hydroxykarboxylové receptory HCA1 a HCA2. Tieto receptory sa nachádzajú na adipocytoch a ich aktiváciou dochádza k inhibícii lipolýzy s následným zlepšením hladiny krvných lipidov [91].



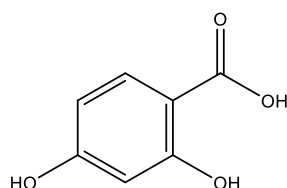
Obr. 18. KYSELINA 3-HYDROXYBENZOOVÁ

Kyselina 4-hydroxybenzoová tiež nazývaná aj kyselina *p*-hydroxybenzoová sa používa najmä ako potravinový konzervant, ale taktiež môže mať emulgujúce účinky a potláča vznik korózie. Vo svojej štruktúre má naviazanú hydroxylovú skupinu, vďaka čomu pôsobí aj ako antioxidant. Využíva sa aj ako medziprodukt pri výrobe farbív a kozmetiky [92].



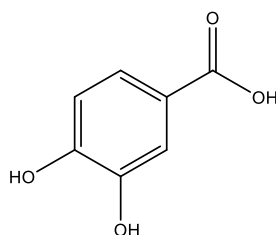
Obr. 19. KYSELINA 4-HYDROXYBENZOOVÁ

Kyselina 2,4-dihydroxybenzoová nazývaná tiež aj ako kyselina β -rezorcylová vzniká pri degradácii flavónolu morínu, ktorý sa líšia od kvercetínu len polohou dvoch hydroxylových skupín. Nachádza sa v avokáde, červenom víne a v rastline ako je *Hypericum perforatum*, ktorá sa používa na zmiernenie príznakov miernej až stredne ťažkej depresie. Boli u nej zistené protirakovinové, antiparazitné a antibakteriálne vlastnosti [93, 94].



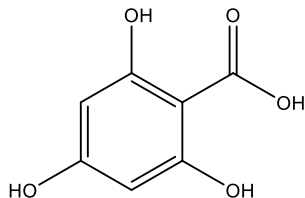
Obr. 20. KYSELINA 2,4-DIHYDROXYBENZOOVÁ KYSELINA

Kyselina 3,4-dihydroxybenzoová nazývaná aj kyselina protokatechuová sa nachádza v potravinách ako je pohánka, jahody, čakanka, olivy, hrozno a ďalšie. Na základe rôznych štúdií prebiehajúcich *in vitro* sa zistilo, že má protizápalový účinok a tiež podporuje antioxidantné mechanizmy v organizme. Boli zistené aj priaznivé účinky pri vysokej hladine glukózy v krvi [91].



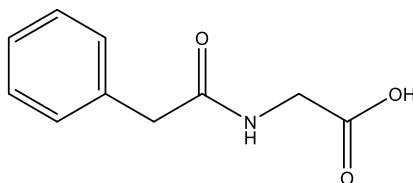
Obr. 21. KYSELINA 3,4-DIHYDROXYBENZOOVÁ KYSELINA

Kyselina 2,4,6-trihydroxybenzoová nazývaná tiež aj ako kyselina floroglucínová vzniká pri oxidácii flavonoidu kvercetínu. Taktiež sa zistilo, že táto zlúčenina vzniká pri fermentácii zeleného a čierneho čaju, kedy dochádza k rozkladu flavonoidov na jednoduché fenoly [95, 96].



Obr. 22. KYSELINA 2,4,6-TRIHIDROXYBENZOOVÁ

Kyselina benzoylaminoctová známa aj pod názvom kyselina hippurová sa vylučuje močom a jej koncentrácia v tele sa zvyšuje po príjme potravín ako je víno, čaj a ovocné džúsy. Tieto potraviny obsahujú fenolické zlúčeniny, z ktorých vzniká po rozklade kyselina benzoová a tá je následne konjugovaná s aminokyselinou glycínom na kyselinu hippurovú. Taktiež vzniká aj ako produkt fermentácie citrusových plodov a rutínu [96, 97].



Obr. 23. KYSELINA BENZOYLAMINOCTOVÁ

4. Cieľ práce

Cieľom tejto diplomovej práce bolo zistiť, ako interagujú vybrané metabolity flavonoidov, deriváty kyseliny benzoovej s meďou pomocou *in vitro* a *ex vivo* metód. Čiastočným cieľom práce bolo:

- a) Stanovenie vplyvu testovaných látok na produkciu hydroxylových radikálov v rámci meďou-katalyzovanej Fentonovej reakcie.
- b) Overenie antioxidačného alebo pro-oxidačného pôsobenia testovaných látok na meďou-navodenej lýze červených krviniek.
- c) Stanovenie vzťahu medzi štruktúrou fenolických metabolitov a ich aktivitou.

5. Experimentálna časť

5.1 Použitý materiál a pomôcky

5.1.1 Chemikálie

- pentahydrát síranu meďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich, Nemecko)

testované látky:

- kyselina benzoová (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- kyselina 3-hydroxybenzoová (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- kyselina 4-hydroxybenzoová (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- kyselina 2,4-dihydroxybenzoová (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- kyselina 3,4-dihydroxybenzoová (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- kyselina 2,4,6-trihydroxybenzoová (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- kyselina benzoylaminoctová (kyselina hippurová) (Sigma-Aldrich, Nemecko)

chemikálie pre prípravu pufrov:

- octan sodný bezvodý (CH_3COONa) (Penta, ČR)
- kyselina octová (CH_3COOH) (Penta, ČR)
- tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) (Sigma-Aldrich, Nemecko)

ďalšie látky:

- kyselina salicylová (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- disodná soľ kyseliny etylendiamintetraoctové (Na_2EDTA) (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- peroxid vodíka (H_2O_2 , 30%) (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- kyselina fosforečná (H_3PO_4 , 85%) (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- katechol (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- kyselina 2,3-dihydroxybenzoová (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- triethylamin (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- kyselina chlorovodíková (HCl , 35%) (Penta, ČR)

- glukóza (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Triton X (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- dithiotreitol (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- laktát sodný (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- nikotínamid adenín dinukleotid (NAD⁺) (Toronto Research Chemicals, Kanada)
- dihydrogenfosforečnan draselný (KH₂PO₄) (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- hydrogenfosforečnan draselný (K₂HPO₄) (Penta,ČR)
- heparín 5000 IU/ml bol zakúpený ako originálny registrovaný preparát od Zentivy (ČR)
- fyziologický roztok bol zakúpený ako originálny registrovaný preparát od B.Braun (Nemecko)

rozpúšťadla:

- metanol (Fisher Chemical, UK)
- acetonitril (Fisher Chemical, UK)
- dimethylsulfoxid (DMSO) (Penta,ČR)
- superčistá voda bola pripravená pomocou prístroja Milli-Q RG (Merck Millipore, Massachusetts, USA)

5.1.2 Prístroje a pomôcky

- pumpa ESA model 582 (ESA, Massachusetts, USA)
- coulometrický detektor Coulochem III (ESA, Massachusetts, USA)
- monolitická HPLC kolóna Onyx C8 - 100 x 4.6 mm (Phenomenex, Kalifornia, USA)
- spektrofotometer pre mikrotitračnú dosičku (Hidex Sense Beta Plus, Fínsko)
- analytické váhy Kern ALT 220-4NM (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Nemecko)
- vortex mixér IKA Vortex Genius 3 (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Nemecko)
- mikrostriekačka – 50 µl (Hamilton Company, Nevada, USA)
- automatické jednokanálové pipety (Brand, Nemecko): 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl
- viacej kanálová pipeta (Biohit, Nemecko): 30-300 µl
- mikrotitračné dosičky – 96 jamôk (Brand, Nemecko)

- mikroskúmavky – 1,5 ml (Eppendorf, Nemecko)
- špičky k pipetám o objemu 10 μ l, 200 μ l, 1000 μ l a 5 ml (Eppendorf, Nemecko)
- skúmavky centrifugálne – 15 ml a 50 ml (Brand, Nemecko)
- centrifúga VWR Compact Star CS4 (VWR International Ltd, Spojené Kráľovstvo)
- centrifúga MIKRO 22R (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Nemecko)
- inkubátor Hood TH 15 (Edmund Bühler GmbH, Nemecko)

5.1.3 Biologický materiál

Pre niektoré pokusy bola využitá potkania krv (samci kmeňa Wistar: Han, VELAZ, s.r.o., ČR) získaná ako vedľajší produkt z experimentov, pri ktorých sa využíva potkania aorta na testovanie vazodilatačných účinkov (schválený projekt MŠMT-4937_2019-9).

5.2 Metodický postup

5.2.1 HPLC metóda

- stanovenie pôsobenia testovaných látok na produkciu hydroxylových radikálov vznikajúcich počas meďou-katalyzovanej Fentonovej reakcie

Pred experimentom:

Príprava zásobných roztokov

- Roztok meďnatých iónov (Cu^{2+}) – 5mM roztok Cu^{2+} bol pripravený rozpúšťaním príslušného množstva pentahydrátu síranu meďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $M_w = 249,69$ g/mol) v ultračistej vode.
- Roztok pufru o pH 4,5 - bol pripravený zmiešaním vodných roztokov octanu sodného a kyseliny octovej. Konkrétne tento acetátový pufor obsahoval 15mM roztok octanu sodného a 27,3mM roztok kyseliny octovej.
- Roztok pufru o pH 7,5 – 5mM TRIS bol pripravený rozpúšťaním príslušného množstva TRIS vo vode.
- Zásobné 5mM roztoky testovaných látok – boli pripravené rozpúšťaním potrebného množstva testovaných látok v metanole. Následne boli nariedene v metanole na dosiahnutie požadovanej koncentrácie.
- Zásobný 66,67mM roztok kyseliny salicylovej – bol pripravený rozpúšťaním kyseliny salicylovej v metanole.
- Zásobné 10mM roztoky štandardov (katechol, kyselina 2,3-dihydroxybenzoová a kyselina 2,5-dihydroxybenzoová) - boli pripravené rozpúšťaním vo vode.

Príprava pracovných roztokov

- Príprava štandardov – v mikroskúmavke sme zmiešali 27 μl 10 μM roztoku katecholu, 130 μl 1 μM roztoku 2,5-DHBA, 130 μl 1 μM 2,3-DHBA a 713 μl vody.
- Príprava kontrolných vzoriek – v mikroskúmavke sme zmiešali 700 μl pufru (pH 4,5 alebo 7,5), 200 μl metanolu, 50 μl 40 μM Cu^{2+} , 45 μl 66,67mM kyseliny salicylovej v metanole a 5 μl peroxidu vodíka.

- Príprava vzoriek – v mikroskúmavke sme zmiešali 700 μl pufru (pH 4,5 alebo 7,5), 200 μl testovanej látky o rôznej koncentrácii, 50 μl 40 μM Cu^{2+} , 45 μl 66,67mM kyseliny salicylovej v metanole a 5 μl peroxidu vodíka.

Príprava mobilnej fázy

- Príprava 5mM H_3PO_4 pufru – v kadičke sme zmiešali 68 μl kyseliny fosforečnej a 199,932 ml vody. Pridali sme 10 ml 20mM EDTA vo vode. Potom sme nastavili pH roztoku na 2,85 pomocou trietylaminu. Takto vytvorený pufor sme prefiltrovali pomocou aparatury na vákuovú filtráciu.
- V odmernej banke sme zmiešali pripravený H_3PO_4 pufor s acetonitrilom v pomere 93:7. Následne sme takto vytvorenú mobilnú fázu nechali 5 minút v ultrazvukovom kúpeli.

Vykonanie experimentu:

1. Nastavili sme si HPLC prístroj v izokratickom režime s prietokovou rýchlosťou 1,0 ml/min.
2. Nariedili sme si testované látky v metanole na tieto koncentrácie: 0,05 μM , 0,1 μM , 0,5 μM , 5 μM , 10 μM , 50 μM , 100 μM , 500 μM , 1000 μM .
3. Najprv sme si v mikroskúmavke pripravili zmes štandardov vo vode: 27 μl 10 μM roztoku katecholu, 130 μl 1 μM roztoku 2,5-DHBA, 130 μl 1 μM 2,3-DHBA a 713 μl vody.
4. Následne sme pomocou Hamiltonovej mikrostriekačky aplikovali 20 μl pripravenej zmesi do HPLC prístroja a zmerali plochu píkov štandardov o známej koncentrácii.
5. Krok 3 a 4 sme zopakovali trikrát a výsledné hodnoty sme spriemerovali.
6. Následne sme si v mikroskúmavke pripravili kontrolné vzorky, ktoré boli zložené zo 700 μl pufru o pH 4,5 alebo 7,5, 200 μl metanolu, 50 μl 40 μM Cu^{2+} iónov, 45 μl 66,67mM kyseliny salicylovej a 5 μl 30% peroxidu vodíka.
7. Fentonovu reakciu sme nechali prebiehať 3 minúty pri laboratórnej teplote za stáleho miešania.
8. Následne sme pomocou Hamiltonovej mikrostriekačky aplikovali 20 μl pripravenej zmesi do HPLC prístroja a zmerali plochu vznikajúcich analytov, ktorými boli katechol, kyselina 2,3-dihydroxybenzoová (2,3-DHBA) a kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (2,5-DHBA).
9. Krok 6 až 8 sme zopakovali štyrikrát a výsledné hodnoty sme spriemerovali.

10. Potom sme v mikroskúmavkách pripravili roztoky vzoriek, ktoré boli zložením podobné kontrolným roztokom, ale namiesto metanolu sme použili roztoky testovaných metabolitov v metanole v rôznych koncentráciách.
11. Po 3 minútach sme pomocou Hamiltonovej mikrostriekačky aplikovali 20 μ l pripravenej zmesi do HPLC prístroja a opäť zmerali množstvo vznikajúcich analytov.
12. Krok 10 a 11 sme zopakovali pri všetkých koncentráciách tej istej testovanej zlúčeniny trikrát a výsledne hodnoty sme spriemerovali.
13. Nakoniec sme z výsledných hodnôt zhotovila grafy pre jednotlivé testované zlúčeniny a určili, ktoré metabolity flavonoidov a v akej koncentrácii majú antioxidačne, prípadne pro-oxidačne vlastnosti.

5.2.2 Lýza červených krviniek

Pred experimentom:

Príprava zásobných roztokov

- Fosfátový pufo - obsahoval 8,5 % 200mM roztoku dihydrogenfosforečnanu draselného KH_2PO_4 a 91,5 % 200mM roztoku hydrogenfosforečnanu draselného K_2HPO_4 . Jeho výsledné pH bolo 7,8.
- Lyzačný pufo - vodný roztok bol pripravený z 200mM fosfátového pufru (pH 7,8), 10% Tritonu X, 0,1M EDTA, 1M dithiotreitolu a ultračistej vody.
- Reakčný pufo - vodný roztok bol pripravený z 2M laktátu, 6mM NAD^+ a 0,1M TRIS. Výsledné pH pufru bolo 8,9.
- Príprava zásobného roztoku pentahydrátu síranu meďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) – $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ bol rozpustený vo fyziologickom roztoku na koncentráciu 10 mM.

Príprava pracovných roztokov

- Asi 50 ml 1mM roztoku glukózy vo fyziologickom roztoku sme zohriali na 37 °C.
- Asi 50 ml pripraveného zásobného roztoku $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ sme zohriali na 37 °C.
- Asi 25 ml fyziologického roztoku sme zohriali na 37 °C.
- Pripravili sme potrebné množstvo lyzačného pufru podľa počtu vzoriek (na 1 vzorku je potrebné použiť 950 μ l pufru).

Vykonanie experimentu:

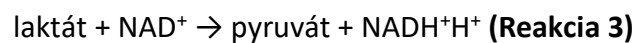
- 1) Potkaniu krv sme hneď po odbere vložili do centrifúgy (VWR CS4) a nechali ju centrifugovať pri 5 400 otáčkach za minútu (2 770 g) po dobu 10 minút.
- 2) Následne sme krvnú plazmu odstránili zo skúmavky.
- 3) Zvyšné červené krvinky sme zmiešali s dvojnásobným množstvom fyziologického roztoku, ktorý bol zohriaty na 37 °C a nechali sme centrifugovať pri 5 400 otáčkach za minútu (2 770 g) po dobu 10 minút.
- 4) Následne sme odstránili supernatant a znovu zopakovali krok č. 3.
- 5) Potom sme naposledy odstránili supernatant a preniesli sme očistené červené krvinky do 50 ml skúmavky.
- 6) Do skúmaviek sme pridali 20 µl heparínu (5 000 UI / 1 ml) na 1 ml suspenzie červených krviniek, aby sme zabránili ich zrážaniu.
- 7) Červené krvinky sme zmiešali s 9-násobným prebytkom 1mM roztoku glukózy vo fyziologickom roztoku zohriateho na 37 °C.
- 8) Pripravili sme si 1,5 ml mikroskúmavky v duplikáte (pred lýzou a po lýze).
- 9) Reverzným pipetovaním sme do pripravených mikroskúmaviek preniesli 0,940 ml suspenzie červených krviniek.
- 10) Do pripravených mikroskúmaviek sme tiež napipetovali 10 µl testovaných zlúčenín v požadovaných koncentráciách a do kontrolných vzoriek sme napipetovali 10 µl rozpúšťadla DMSO. Každú vzorku sme pripravili duplicitne. Následne sme pridali 50 µl 10mM roztoku medi, okrem kontrolných vzoriek, ktoré obsahovali 50 µl fyziologického roztoku. Boli pripravené 2 pozitívne slepé skúšky (DMSO s Cu^{2+} iónmi) a 2 negatívne slepé skúšky (DMSO s fyziologickým roztokom).
- 11) Sériu vzoriek sme následne nechali 4 hodiny inkubovať pri 37 °C v inkubátore pri 100 ot./min.
- 12) Po skončení inkubácie sme vzorky preniesli do centrifúgy (MIKRO 22R), ktorú sme nastavili na 5 400 ot./min. (1 950 g) na dobu 10 minút.
- 13) Z každej vzorky sme do pripravenej mikroskúmavky preniesli 250 µl supernatantu a nechali ich zamraziť na -80 °C.
- 14) Z pôvodných vzoriek sme odstránili zvyšný supernatant a pridali sme 0,950 ml lyzačného pufu. Potom sme ich zvortexovali a nechali 20 minút stáť pri izbovej teplote.

15) Znova sme vzorky preniesli do centrifúgy (MIKRO 22R) nastavenej na 10 000 ot./min (6 700 g) na dobu 10 minút.

16) Po ukončení centrifúgy sme znovu odobrali 250 µl z každej vzorky a nechali zamraziť na -80 °C. Následne sme museli do 3 dní takto pripravené vzorky ďalej spracovať.

Meranie laktátdehydrogenázovej (LDH) aktivity:

- Na stanovenie LDH aktivity sa využíva reakcia laktátu s NAD⁺ (nikotínamid adenín dinukleotid) (Reakcia 3) a vytvorený produkt NADH⁺H⁺ sa stanovuje spektrofotometrickým meraním.



- V deň merania sme si pripravili reakčný pufr a asi 1 hodinu pred začiatkom experimentu sme z chladničky vybrali všetky vzorky, aby mali počas merania izbovú teplotu.
- Absorbanciu sme merali pomocou spektrofotometru (Hidex Sense Beta Plus) za izbovej teploty a pri vlnovej dĺžke 340 nm. Pri tejto vlnovej dĺžke sa absorbuje vznikajúci NADH.
- Rozmrazené vzorky pred lýzou sme tesne pred meraním zriedili fyziologickým roztokom v pomere 1:2 (vzorka:fyziologický roztok) a vzorky po lýze sme riedili v pomere 1:5 (vzorka:fyziologický roztok).
- Na mikrotitračnú doštičku sme duplicitne napipetovali 50 µl zvortexovanej zriedenej vzorky a 300 µl reakčného pufru.
- Hneď po napipetovaní reakčného pufru sme merali zmeny v absorbancii pri vlnovej dĺžke 340 nm.

5.3 Matematické a štatistické vyhodnotenie

5.3.1 HPLC metóda

Percento zníženia (antioxidačný účinok) alebo zvýšenia (pro-oxidačný účinok) produkcie hydroxylových radikálov bolo vypočítané zo súčtu koncentrácií katecholu, 2,3-DHBA a 2,5-DHBA medzi testovanou vzorkou a kontrolnou vzorkou, ktorá obsahovala namiesto testovanej zlúčeniny iba rozpúšťadlo.

Výsledky sú prezentované ako priemer \pm smerodajnej odchýlky vypočítanej podľa vzorca $\sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n-1}}$. Štatistické porovnanie produkcie hydroxylových radikálov bolo prevedené použitím testu ANOVA nasledovaného Dunnettovým post-hoc testom.

Grafické a štatistické spracovanie bolo vykonané pomocou programu GraphPad Prism verzia 9.0 pre Windows (GraphPad Software, USA).

5.3.2 Lýza červených krviniek

Celkové percento hemolýzy erythrocytov bolo určené zo smerníc získaných meraním aktivity LDH podľa vzorca: $\frac{2 \times k_{BL}}{2 \times k_{BL} + 6 \times k_{PL}}$, kde je BL vzorka bez lýzy (riedený 1:2) a PL je vzorka po lýze (riedený 1:5).

Potom bola porovnaná miera hemolýzy vzoriek obsahujúcich testované látky s pozitívnymi alebo negatívnymi slepými vzorkami (to znamená buď s roztokom Cu^{2+} alebo s fyziologickým roztokom namiesto roztoku Cu^{2+}) podľa vzorca: $1 - \left(\frac{\% \text{ lýzy vzorek}}{\% \text{ lýzy slepý vzorek}} \right)$. Takto zisťujeme, či má alebo nemá testovaná látka vplyv na hemolýzu erythrocytov.

Výsledky sú ukázané ako priemer \pm smerodajnej odchýlky vypočítanej podľa vzorca: $\sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n-1}}$. Štatistická významnosť výsledkov bola stanovená pomocou študentova T-testu porovnávaním celkovej hemolýzy jednotlivých vzoriek so slepými vzorkami. Grafické a štatistické spracovanie bolo vykonané pomocou programu GraphPad Prism verzia 9.0 pre Windows (GraphPad Software, USA).

6. Výsledky

6.1 HPLC metóda

Podľa postupu, uvedenom v kapitole 5.2.1, bol skúmaný vplyv siedmych testovaných látok (kyselina benzoová, kyselina 3-hydroxybenzoová, kyselina 4-hydroxybenzoová, kyselina 2,4-dihydroxybenzoová, kyselina 3,4-dihydroxybenzoová, kyselina 2,4,6-trihydroxybenzoová a kyselina benzoylaminoctová) na produkciu hydroxylových radikálov vznikajúcich počas meďou-katalyzovanej Fentonovej reakcie pri dvoch (pato)fyziologických hodnotách pH 4,5 a 7,5 (Obr. 24-30). Teda pH blízke neutrálnemu pH, a taktiež pH, ktoré imituje výraznú acidózu, pH lyzozómov alebo môže byť pozorované v žalúdku.

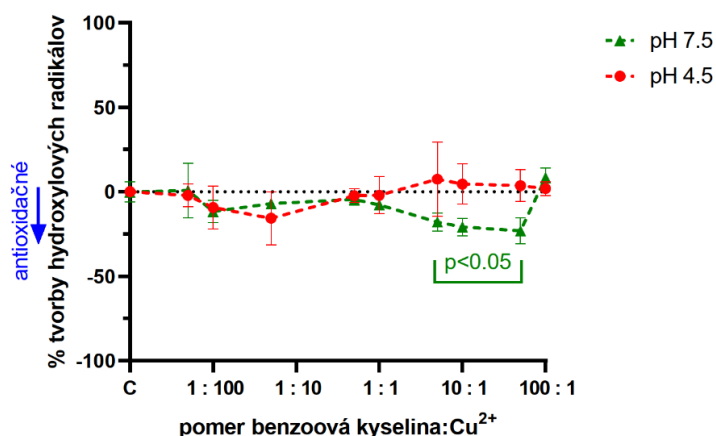
Zo všetkých testovaných zlúčenín boli schopné blokovať meďou-katalyzovanú Fentonovu reakciu a mať teda antioxidantné účinky pri oboch testovaných hodnotách pH len tri metabolity flavonoidov a to kyselina 4-hydroxybenzoová, kyselina 2,4-dihydroxybenzoová a kyselina 3,4-dihydroxybenzoová (Obr. 26-28). V prípade kyseliny benzoovej bol pozorovaný antioxidantný účinok pri koncentračných pomeroch 5:1 až 50:1 (kyselina benzoová:Cu²⁺) iba pri pH 7,5. V prostredí s pH 4,5 mala kyselina neutrálne pôsobenie (Obr. 24).

Najsilnejší antioxidantný účinok bol dokázaný u kyseliny 2,4-dihydroxybenzoovej, ktorá pri pH 4,5 inhibovala tvorbu hydroxylových radikálov už pri nízkom pomere koncentrácií 1:100 (kyselina 2,4-dihydroxybenzoová:Cu²⁺). Pri pH 7,5 bol antioxidantný účinok štatisticky významný od pomeru 1:2 (kyselina 2,4-dihydroxybenzoová:Cu²⁺) (Obr. 27).

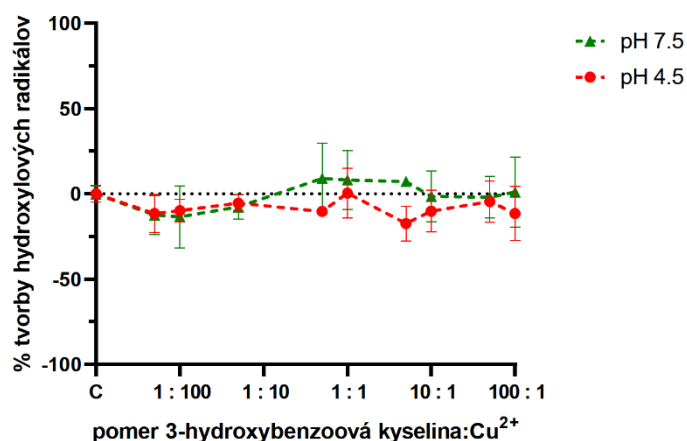
Naproti tomu dva metabolity flavonoidov boli schopné zosilniť meďou-katalyzovanú Fentonovu reakciu a mali tak pro-oxidačný účinok. Išlo o kyselinu 2,4,6-trihydroxybenzoovú, ktorá vykazovala postupný nárast tvorby hydroxylových radikálov so zvyšujúcou sa koncentráciou. V pH 7,5 bol tento pro-oxidačný účinok štatisticky významný od koncentračného pomeru 10:1 (kyselina 2,4,6-trihydroxybenzoová:Cu²⁺) a pri pH 4,5 od koncentračného pomeru 50:1 (kyselina 2,4,6-trihydroxybenzoová:Cu²⁺) (Obr. 29). Druhou látkou bola kyselina benzoylaminoctová (kyselina hippurová). Ta mala štatisticky významný pro-oxidačný účinok pri pH 4,5 od koncentračného pomeru 10:1 (kyselina benzoylaminoctová:Cu²⁺) a pri pH 7,5 dosiahol tento účinok významné hodnoty iba v jednom koncentračnom bode a to pri pomere 100:1 (kyselina benzoylaminoctová:Cu²⁺) (Obr. 30).

Kyselina 3-hydroxybenzoová vykazovala nevýznamný vplyv na tvorbu hydroxylových radikálov pri oboch hodnotách pH u všetkých testovaných koncentráciách (Obr. 25).

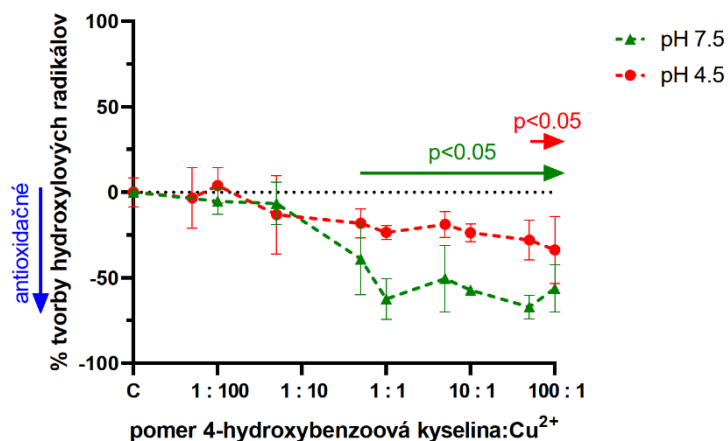
Z výsledkov je jasné, že ide o látky s rozdielnym pôsobením na produkciu hydroxylových radikálov vznikajúcich meďou-katalyzovanou Fentonovou reakciou a ich účinok sa tiež mení v závislosti na pH prostredia.



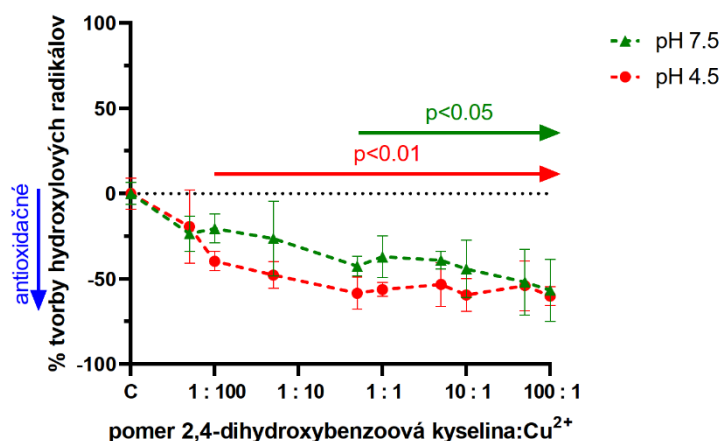
Obr. 24. VPLYV KYSELINY BENZOOVEJ NA PRODUKCIU HYDROXYLOVÝCH RADIKÁLOV Z MEĎOU-KATALYZOVANEJ FENTONOVEJ REAKCIE PRI pH 4,5 a 7,5. C: pozitívna kontrola, ktorá sa líšila od ostatných vzoriek len absenciou testovanej látky, namiesto nej obsahovala len rozpúšťadlo. Finálna koncentrácia meďnatých iónov bola 2 μ M.



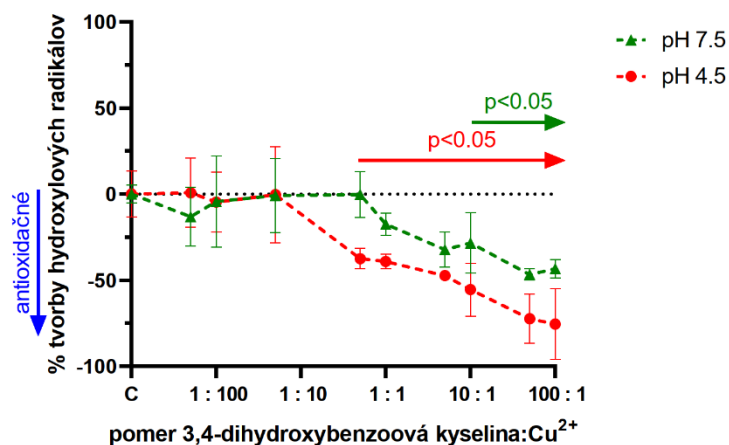
Obr. 25. VPLYV KYSELINY 3-HYDROXYBENZOOVEJ NA PRODUKCIU HYDROXYLOVÝCH RADIKÁLOV Z MEĎOU-KATALYZOVANEJ FENTONOVEJ REAKCIE PRI pH 4,5 a 7,5. C: pozitívna kontrola, ktorá sa líšila od ostatných vzoriek len absenciou testovanej látky, namiesto nej obsahovala len rozpúšťadlo. Finálna koncentrácia meďnatých iónov bola 2 μ M.



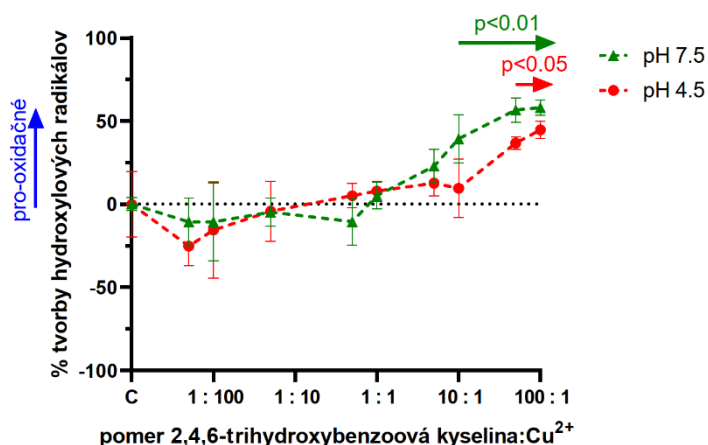
Obr. 26. VPLYV KYSELINY 4-HYDROXYBENZOOVEJ NA PRODUKCIU HYDROXYLOVÝCH RADIKÁLOV Z MEĎOU-KATALYZOVANEJ FENTONOVEJ REAKCIE PRI pH 4,5 a 7,5. C: pozitívna kontrola, ktorá sa líšila od ostatných vzoriek len absenciou testovanej látky, namiesto nej obsahovala len rozpúšťadlo. Finálna koncentrácia meďnatých iónov bola 2 μ M.



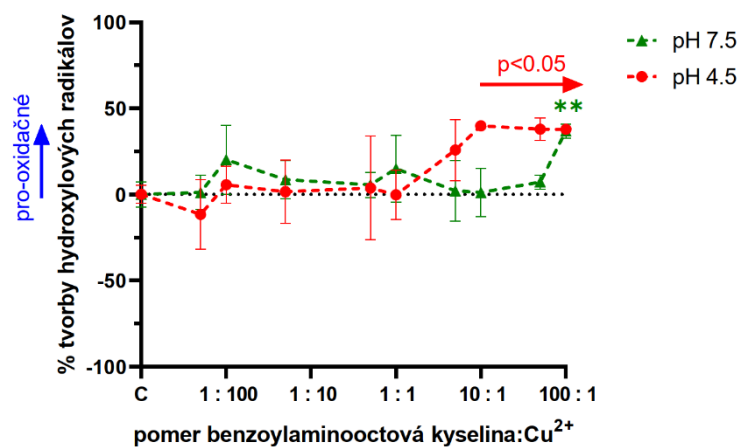
Obr. 27. VPLYV KYSELINY 2,4-DIHYDROXYBENZOOVEJ NA PRODUKCIU HYDROXYLOVÝCH RADIKÁLOV Z MEĎOU-KATALYZOVANEJ FENTONOVEJ REAKCIE PRI pH 4,5 a 7,5. C: pozitívna kontrola, ktorá sa líšila od ostatných vzoriek len absenciou testovanej látky, namiesto nej obsahovala len rozpúšťadlo. Finálna koncentrácia meďnatých iónov bola 2 μ M.



Obr. 28. VPLYV KYSELINY 3,4-DIHYDROXYBENZOOVEJ NA PRODUKCIU HYDROXYLOVÝCH RADIKÁLOV Z MEĎOU-KATALYZOVANEJ FENTONOVEJ REAKCIE PRI pH 4,5 a 7,5. C: pozitívna kontrola, ktorá sa líšila od ostatných vzoriek len absenciou testovanej látky, namiesto nej obsahovala len rozpúšťadlo. Finálna koncentrácia meďnatých iónov bola 2 μ M.



Obr. 29. VPLYV KYSELINY 2,4,6-TRIHYDROXYBENZOOVEJ NA PRODUKCIU HYDROXYLOVÝCH RADIKÁLOV Z MEĎOU-KATALYZOVANEJ FENTONOVEJ REAKCIE PRI pH 4,5 a 7,5. C: pozitívna kontrola, ktorá sa líšila od ostatných vzoriek len absenciou testovanej látky, namiesto nej obsahovala len rozpúšťadlo. Finálna koncentrácia meďnatých iónov bola 2 μ M.



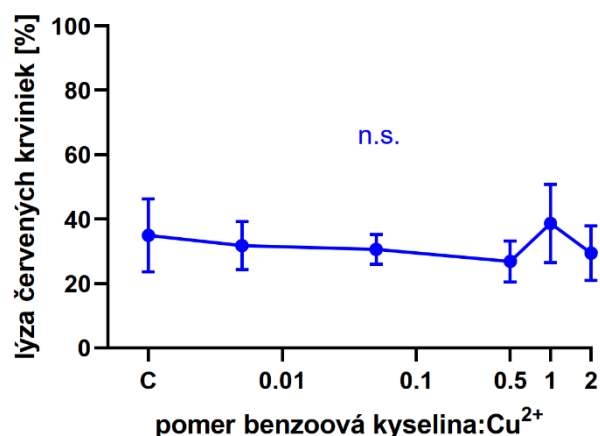
Obr. 30. VPLYV KYSELINY BENZOYLAMINOCTOVEJ NA PRODUKCIU HYDROXYLOVÝCH RADIKÁLOV Z MEĎOU-KATALYZOVANEJ FENTONOVEJ REAKCIE PRI pH 4,5 a 7,5. ** odpovedá $p < 0,01$ vs. pozitívna kontrola. C: pozitívna kontrola, ktorá sa líšila od ostatných vzoriek len absenciou testovanej látky, namiesto nej obsahovala len rozpúšťadlo. Finálna koncentrácia meďnatých iónov bola $2 \mu\text{M}$.

6.2 Lýza červených krviniek

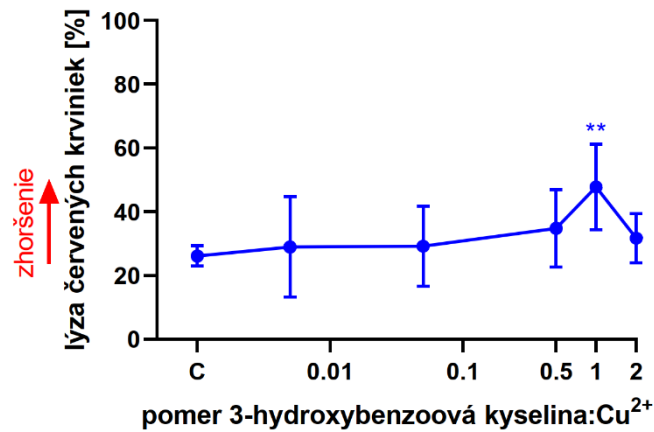
Podľa postupu, uvedeného v kapitole 5.2.2, bol skúmaný vplyv znova všetkých siedmich testovaných látok na meďou-vyvolanú lýzu červených krviniek (Obr. 31-37). Priemerná lýza červených krviniek spôsobená pridaním Cu^{2+} iónov (vo finálnej koncentrácii $500 \mu\text{M}$) bola po 4 hodinách inkubácie $32,9 \pm 9,4 \%$. Spontánna lýza bez pridania týchto iónov bola $1,5 \pm 0,8 \%$.

Na základe získaných výsledkov vieme posúdiť, že žiadna z testovaných zlúčenín nedokázala ochrániť potkanie erytrocyty pred toxicitou medi. Päť zo siedmich testovaných látok (kyselina benzoová, kyselina 4-hydroxybenzoová, kyselina 2,4-dihydroxybenzoová, kyselina 3,4-dihydroxybenzoová a kyselina benzoylaminoctová) lýzu červených krviniek nezastavilo, ale ani ju nezhoršovalo. Ich účinok bol teda neutrálny (Obr. 31, 33-35 a 37).

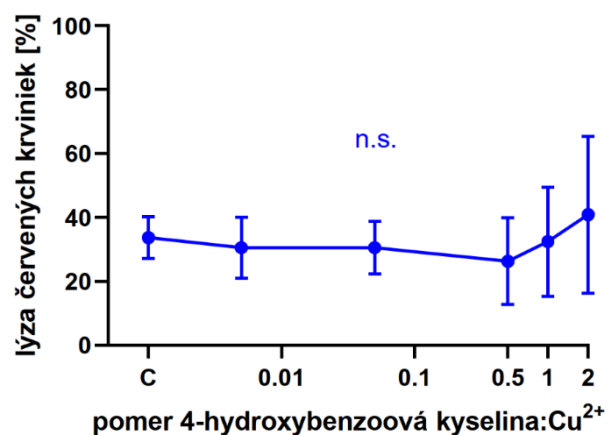
U dvoch testovaných zlúčenín (kyselina 3-hydroxybenzoová a kyselina 2,4,6-trihydroxybenzoová) sme pozorovali zhoršenie hemolýzy. U kyseliny 3-hydroxybenzoovej bolo pro-oxidačné pôsobenie štatisticky významné len pri koncentračnom pomere 1:1 (kyselina 3-hydroxybenzoová: Cu^{2+}) (Obr. 32). U kyseliny 2,4,6-trihydroxybenzoovej sme pozorovali narastajúcu lýzu erytrocytov vyvolanou meďou so zvyšujúcou sa koncentráciou testovanej látky. Pro-oxidační účinok bol významný od koncentračného pomeru 1:2 (kyselina 2,4,6-trihydroxybenzoová: Cu^{2+}) (Obr. 36).



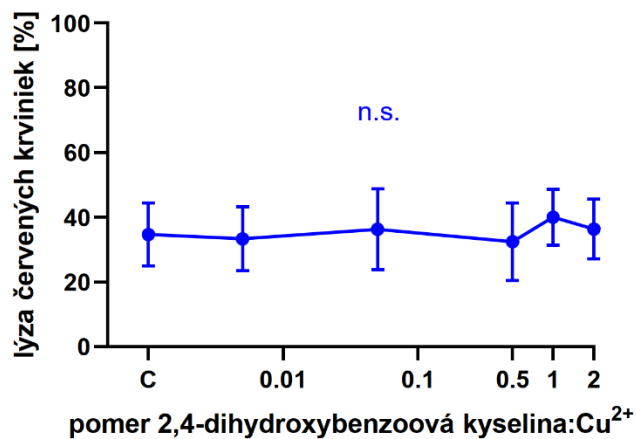
Obr. 31. VPLYV KYSELINY BENZOOVEJ NA MEĎOU-VYVOLANÚ LÝZU ČERVENÝCH KRVINIEK. n.s. – nesignifikantná. C: pozitívna kontrola, ktorá sa líšila od ostatných vzoriek len absenciou testovanej látky, namiesto nej obsahovala len rozpúšťadlo. Finálna koncentrácia medi bola vždy $500 \mu\text{M}$.



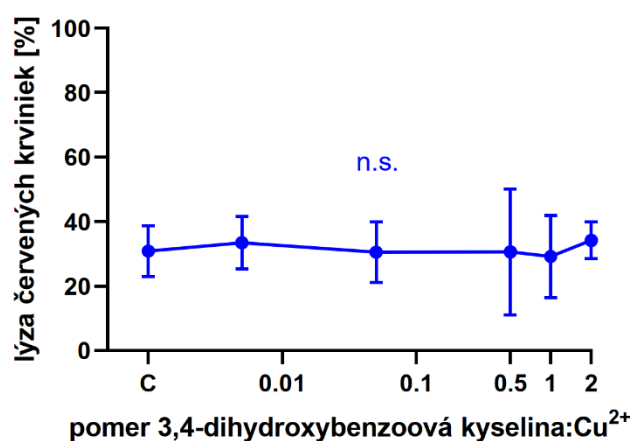
Obr. 32. VPLYV KYSELINY 3-HYDROXYBENZOOVEJ NA MEĎOU-VYVOLANÚ LÝZU ČERVENÝCH KRVINIEK. ** odpovedá $p < 0,01$ oproti pozitívnej kontrole. C: pozitívna kontrola, ktorá sa líšila od ostatných vzoriek len absenciou testovanej látky, namiesto nej obsahovala len rozpúšťadlo. Finálna koncentrácia medi bola vždy $500 \mu\text{M}$.



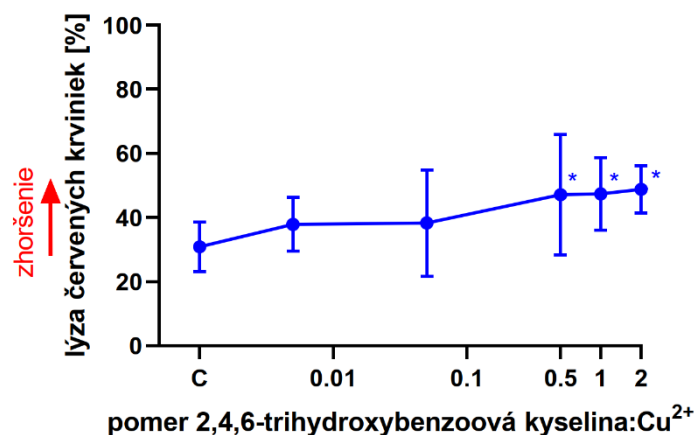
Obr. 33. VPLYV KYSELINY 4-HYDROXYBENZOOVEJ NA MEĎOU-VYVOLANÚ LÝZU ČERVENÝCH KRVINIEK. n.s. – nesignifikantná. C: pozitívna kontrola, ktorá sa líšila od ostatných vzoriek len absenciou testovanej látky, namiesto nej obsahovala len rozpúšťadlo. Finálna koncentrácia medi bola vždy $500 \mu\text{M}$.



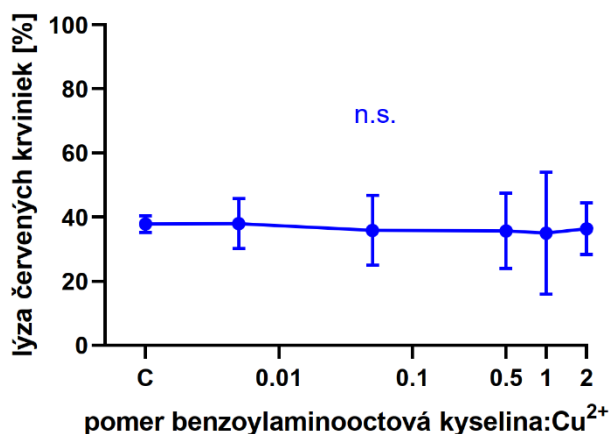
Obr. 34. VPLYV KYSELINY 2,4-DIHYDOXYBENZOOVEJ NA MEĎOU-VYVOLANÚ LÝZU ČERVENÝCH KRVINIEK. n.s. – nesignifikantná. C: pozitívna kontrola, ktorá sa líšila od ostatných vzoriek len absenciou testovanej látky, namiesto nej obsahovala len rozpúšťadlo. Finálna koncentrácia medi bola vždy 500 μ M.



Obr. 35. VPLYV KYSELINY 3,4-DIHYDOXYBENZOOVEJ NA MEĎOU-VYVOLANÚ LÝZU ČERVENÝCH KRVINIEK. n.s. – nesignifikantná. C: pozitívna kontrola, ktorá sa líšila od ostatných vzoriek len absenciou testovanej látky, namiesto nej obsahovala len rozpúšťadlo. Finálna koncentrácia medi bola vždy 500 μ M.



Obr. 36. VPLYV KYSELINY 2,4,6-TRIHYDOXYBENZOOVEJ NA MEĎOU-VYVOLANÚ LÝZU ČERVENÝCH KRVINIEK. * odpovedá $p < 0,05$. C: pozitívna kontrola, ktorá sa líšila od ostatných vzoriek len absenciou testovanej látky, namiesto nej obsahovala len rozpúšťadlo. Finálna koncentrácia medi bola vždy $500 \mu\text{M}$.



Obr. 37. VPLYV KYSELINY BENZOYLAMINOOCETOVEJ NA MEĎOU-VYVOLANÚ LÝZU ČERVENÝCH KRVINIEK. n.s. – nesignifikantná. C: pozitívna kontrola, ktorá sa líšila od ostatných vzoriek len absenciou testovanej látky, namiesto nej obsahovala len rozpúšťadlo. Finálna koncentrácia medi bola vždy $500 \mu\text{M}$.

7. Diskusia

Flavonoidy sú široko rozšírené prírodné látky, ktoré sa nachádzajú v mnohých rastlinách ako sekundárne metabolity. Do organizmu ich prijímame vo väčšom množstve z potravy, a preto je podrobne skúmaný ich vplyv na ľudské zdravie. V minulosti boli u flavonoidov pozorovane antioxidantné účinky, ktoré môžu byť spôsobené ich schopnosťou priamo vychytávať voľné radikály, chelatovať ióny prechodných kovov alebo inhibovať enzýmy zodpovedné za tvorbu reaktívnych foriem kyslíka [82, 98]. Na druhej strane bola u veľkého množstva flavonoidov detekovaná aj schopnosť potenciovat' med'ou-spustenú Fentonovu reakciu a teda ich pro-oxidačné pôsobenie [99]. Flavonoidy prijímané potravou podliehajú v organizme masívnemu metabolizmu ešte pred dosiahnutím systémového obehu. Sú rozkladané na jednoduché fenolické zlúčeniny, ktorých účinok je zatiaľ preskúmaný v menšej miere. Medzi tieto metabolity radíme aj deriváty kyseliny benzoovej [100-102].

Predošlé štúdie ukázali, že fenolické zlúčeniny majú vysokú antioxidantnú aktivitu, čo znamená, že zabraňujú poškodeniu organizmu tým, že vychytávajú voľné radikály. Aj po reakcii s radikálmi zostávajú stabilné, pretože vo svojej štruktúre obsahujú konjugované dvojité väzby, čo spôsobuje, že sú radikálové elektróny delokalizované [103].

Cieľom tejto diplomovej práce bolo stanoviť schopnosť siedmich benzoových kyselín líšiacich sa počtom a polohou hydroxylových skupín substituovaných na aromatickom kruhu vychytávať voľné hydroxylové radikály vznikajúce počas med'ou-katalyzovanej Fentonovej reakcie a tiež pochopiť vzťah medzi ich štruktúrou a antioxidantnou prípadne pro-oxidačnou aktivitou. Taktiež sme stanovovali aj vplyv testovaných látok na med'ou-navodenú lýzu potkaních erytrocytov, ako viac biologicky relevantný model.

V predošlej štúdii od Velika a Krona (2012) bola meraná antioxidantná aktivita proti superoxidovému radikálu u 14 derivátov benzoových kyselín pomocou metódy podľa Beauchampa a Fridoviche (1971) [104]. Výsledkom tejto štúdie bolo, že monohydroxybenzoové kyseliny vykazovali najlepšiu antioxidantnú aktivitu. Pre antioxidantné pôsobenie bolo dôležité, keď sa hydroxylová skupina nachádzala voči karboxylovej skupine v *ortho* alebo *para* polohe. Naopak látky s hydroxylovou skupinou v *meta* polohe vykázali nižšiu antioxidantnú aktivitu. Ako najlepší antioxidant sa tu ukázala kyselina 2-hydroxybenzoová. Bola účinnejšia aj ako kyselina 4-hydroxybenzoová a obe boli účinnejšie než 3-hydroxybenzoová kyselina. V prípade dihydroxybenzoových kyselín bola antioxidantná aktivita o niečo nižšia.

Látky, ktoré opäť mali OH skupiny v *ortho* alebo *para* polohe voči karboxylovej skupine vykazovali lepšie antioxidačné vlastnosti proti superoxidovému radikálu ako dihydroxybenzoové kyseliny, ktoré mali OH skupiny v *meta* polohe. Ako najhoršie antioxidanty sa ukázali kyselina 3,5-dihydroxybenzoová a 2,6-dihydroxybenzoová, tie mali dokonca pro-oxidačné účinky. V tejto štúdií bola zaradená aj trihydroxybenzoová kyselina, a to konkrétne kyselina 3,4,5-trihydroxybenzoová (kyselina gálová), ktorej OH skupiny sú voči sebe v *ortho* polohe a tým pádom im to umožňuje chelatáciu, ktorá viedla k ich antioxidačnému pôsobeniu [105]. Tieto výsledky iba čiastočne odpovedajú naším nameraným údajom. Aj v našom prípade bola kyselina 4-hydroxybenzoová s OH skupinou v *para* polohe účinnejší antioxidant než kyselina 3-hydroxybenzoová s OH skupinou v *meta* polohe, ktorej pôsobenie bolo neutrálne. A rovnako tak kyselina 2,4-dihydroxybenzoová vykázala o niečo lepšiu schopnosť vychytávať hydroxylové radikály ako kyselina 3,4-dihydroxybenzoová, ktorá má jednu OH skupinu v *meta* polohe. V prípade kyseliny 2,4,6-trihydroxybenzoovej, ktorej OH skupiny sú voči sebe v *meta* polohe, a tým pádom chelatácia nie je možná, čo viedlo k ich rastúcej pro-oxidačnej aktivite. Z našich záverov však jasne vyplýva, že dihydroxysubstituované kyseliny majú lepšiu antioxidačnú aktivitu ako benzoové kyseliny s jednou OH skupinou. Logickým dôvodom by mohol byť fakt, že naša štúdia využívala kovy ako iniciátori tvorby voľných radikálov a látky s *o*-dihydroxyskupinou ich môžu chelatovať. To platí pre kyselinu 3,4-dihydroxybenzoovú. U kyseliny 2,4-dihydroxybenzoovej bude asi kľúčovú úlohu zohrávať priame pôsobenie scavangera, tj. vychytávača voľných radikálov, pretože chelatácia iónov medi je v tomto prípade nepravdepodobná.

Podobné závery ako u predošlej práce boli pozorované tiež v štúdií od Mansouri *et al.* (2005), ktorá porovnávala schopnosť niekoľkých benzoových kyselín vychytávať peroxid vodíka. Ten je síce telu vlastná neradikálová zlúčenina, ktorá môže vznikať pri oxidačných procesoch v organizme, ale taktiež sa môže premeniť na vysoko reaktívny hydroxylový radikál za katalýzy iónmi prechodných kovov. Aj tu mali monohydroxybenzoové kyseliny, konkrétne kyselina 3-hydroxybenzoová a 4-hydroxybenzoová, vyššiu aktivitu ako dihydroxy-substituovaná kyselina 3,4-dihydroxybenzoová. Avšak v tomto prípade bola kyselina 3-hydroxybenzoová s OH skupinou v *meta* polohe účinnejšia než 4-hydroxybenzoová kyselina s OH skupinou v *para* polohe [106].

Oproti tomu k opačným výsledkom dospeli v práci od Moazzen *et al.* (2022), v ktorej bola tiež testovaná antioxidačná aktivita 11 hydroxybenzoových kyselín pomocou metódy

využívajúcej DPPH• (1,1-difenyl-2-(2,4,6- trinitrofenyl)hydrazyl) a ABTS+• (2,2'- azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát). Ukázalo sa, že vyššie antioxidantné účinky zlúčenín sú spôsobené prítomnosťou viac ako jednej hydroxylovej skupiny v molekule. Kyselina 4-hydroxybenzoová tu vykazovala len veľmi slabú aktivitu. Substitúcia hydroxylovej skupiny v *meta* polohe (3 a 5) viedli ku zvýšeniu antioxidantnej aktivity s tým, že najlepšie pôsobenie bolo pozorované u kyseliny 3,5-dihydroxybenzoovej. Naproti tomu zlúčeniny s hydroxylovými substituentmi v *ortho* (2 a 6) a *para* polohách (4) boli menej účinné [103]. Musíme ale nutne pripomenúť, že biologická relevancia použitých syntetických stabilných radikálov DPPH• a ABTS+• je nejasná, a štúdie, ktoré ich využívajú, môžu zistiť len antioxidantné, ale nie pro-oxidantné pôsobenie.

Celkovo môžeme povedať, že závery získané z vyššie uvedených štúdií sa čiastočne potvrdili aj v našej práci. Kyselina benzoová, ktorá nie je substituovaná hydroxylovou skupinou, vykazovala iba mierny antioxidantný účinok v prostredí s neutrálnym pH. Rovnako tak kyselina benzylaminoctová, ktorá neobsahuje žiadnu OH skupinu, ale jej pôsobenie bolo pro-oxidantné. Najvýraznejšiu antioxidantnú aktivitu vykazovali látky substituované dvomi hydroxylovými skupinami. Zaujímavé sú aj rozdielne krivky kyseliny 3,4-dihydroxybenzoovej a 2,4-dihydroxybenzoovej. Ako bolo uvedené vyššie, rozdiely sú asi dané rozdielnym mechanizmom účinku. Kyselina 2,4,6-trihydroxybenzoová obsahuje tri hydroxylové skupiny ale vykazovala rastúcu pro-oxidantnú aktivitu. Môže to byť z dôvodu, že ani jedna z hydroxylových skupín sa nenachádza voči karboxylovej skupine v *meta* polohe. Na základe získaných údajov môžeme teda predpokladať, že poloha a počet hydroxylových skupín má zásadný význam pre určenie antioxidantného účinku benzoových kyselín.

Vďaka uskutočnení *ex vivo* experimentov bolo zistené, že dva deriváty (kyselina 3-hydroxybenzoová a 2,4,6-trihydroxybenzoová) lýzu potkaních erytrocytov navodenou prídavkom medi ešte zhoršovali a stávali sa tak toxickými. V prípade kyseliny 2,4,6-trihydroxybenzoovej odpovedali výsledky záverom z *in vitro* experimentov, že má látka pro-oxidantné pôsobenie. U kyseliny 3-hydroxybenzoovej bolo toxické pôsobenie v *ex vivo* podmienkach pomerne prekvapivé, lebo v *in vitro* experimentoch sa javila len ako neutrálna. Celkovo teda nemôžeme predpokladať, že by tieto látky boli využiteľné ako univerzálne antioxidanty a ich použitie u Wilsonovej chorobe, kde môže dôjsť práve k hemolýze z dôvodu vysokej koncentrácie medi v plazme nie je reálne [107].

Môžeme tak konštatovať, že je vždy nutné preveriť výsledky z *in vitro* testov na *ex vivo* experimentoch alebo v *in vivo* podmienkach. Ak by látky preukázali toxické pôsobenie v *in vivo* testoch a tiež na nádorových bunkách, ktoré všeobecne majú vyšší obsah medi, mohli by nájsť uplatnenie v protinádorovej terapii [108].

8. Záver

Na základe získaných výsledkov sme dospeli k záveru, že antioxidačne najúčinnjším metabolitom flavonoidov bola kyselina 2,4-dihydroxybenzoová, ktorá pôsobila antioxidačne pri pH 4,5 už od koncentračného pomeru 1:100 a pri pH 7,5 od 1:2 (kyselina 2,4-dihydroxybenzoová:Cu²⁺). Kyselina benzoová vykazovala antioxidačný účinok len pri koncentračných pomeroch 5:1 až 50:1 (kyselina benzoová:Cu²⁺) pri pH 7,5. V prípade kyseliny 4-hydroxybenzoovej a 3,4-dihydroxybenzoovej sme pozorovali výrazný antioxidačný účinok len pri vyšších koncentráciách v oboch hodnotách pH. Kyselina 2,4,6-trihydroxybenzoová pôsobila pro-oxidačne pri pH 7,5 od koncentračného pomeru 10:1 a pri pH 4,5 od koncentračného pomeru 50:1 (kyselina 2,4,6-trihydroxybenzoová:Cu²⁺). Taktiež aj kyselina benzoylaminoctová (kyselina hippurová) vykazovala pro-oxidačné vlastnosti pri pH 4,5 od koncentračného pomeru 10:1 a pri pH 7,5 len pri pomere 100:1 (kyselina benzoylaminoctová:Cu²⁺). Jedine kyselina 3-hydroxybenzoová vykazovala neutrálny vplyv.

Tiež sme zistili, že ani jedna z testovaných zlúčenín nie je schopná v žiadnej testovanej koncentrácii zabrániť lýze potkaních erytrocytov vyvolaných meďou. U kyseliny benzoovej, 4-hydroxybenzoovej, 2,4-dihydroxybenzoovej, 3,4-dihydroxybenzoovej a benzoylaminoctovej sme pozorovali neutrálny vplyv. Avšak u kyseliny 3-hydroxybenzoovej a 2,4,6-trihydroxybenzoovej sme pozorovali štatisticky významné zhoršenie hemolýzy pri vyšších koncentračných pomeroch.

Na základe získaných údajov by sme mohli predpokladať, že kyselina 2,4,6-trihydroxybenzoová, ktorá mala pro-oxidačné pôsobenie *in vitro* aj *ex vivo* podmienkach, sa teda nehodí k terapii presýtenia organizmu meďou.

9. Zoznam použitej literatúry

1. The Editors of Encyclopaedia Britannica: Copper. 2022 Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/copper>, stiahnuté 18.12.2022.
2. Barceloux G. D., Dr. Barceloux D.: Copper. Clin. Toxicol. 37, 217 (1999).
3. Royer A., Sharman T.: *Copper Toxicity*. StatPearls Publishing, Treasure Island (Florida) 2022.
4. Olivares M., Uauy R.: Copper as an essential nutrient. Am. J. Clin. Nutr. 63, 791S (1996).
5. Li Y.: Copper homeostasis: Emerging target for cancer treatment. IUBMB Life 72, 1900 (2020).
6. Angelova M., Asenova S., Nedkova V., Koleva-Kolarova R.: Copper in the human organism. Trakia J. Sci. 9, 88 (2011).
7. Michel H., Behr J., Harrenga A., Kannt A.: Cytochrome c oxidase: structure and spectroscopy. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 27, 329 (1998).
8. Li Y., Park J. S., Deng J. H., Bai Y.: Cytochrome c oxidase subunit IV is essential for assembly and respiratory function of the enzyme complex. J. Bioenerg. Biomembr. 38, 283 (2006).
9. Chang T. S.: An updated review of tyrosinase inhibitors. Int. J. Mol. Sci. 10, 2440 (2009).
10. Lai X., Wichers H. J., Soler-Lopez M., Dijkstra B. W.: Structure and Function of Human Tyrosinase and Tyrosinase-Related Proteins. Chem. Eur. J. 24, 47 (2018).
11. Tsang T., Davis C. I., Brady D. C.: Copper biology. Curr. Biol. 31, R421 (2021).
12. Bortolato M., Chen K., Shih J. C.: Monoamine oxidase inactivation: from pathophysiology to therapeutics. Adv. Drug Deliv. Rev. 60, 1527 (2008).
13. Aljanabi R., Alsous L., Sabbah D. A., Gul H. I., Gul M., Bardaweel S. K.: Monoamine Oxidase (MAO) as a Potential Target for Anticancer Drug Design and Development. Molecules 26, 6019 (2021).
14. Petrak J., Vyoral D.: Hephaestin--a ferroxidase of cellular iron export. Int. J. Biochem. Cell Biol. 37, 1173 (2005).
15. Lopez M. J., Royer A., Shah N. J.: *Biochemistry, Ceruloplasmin*. StatPearls Publishing, Treasure Island (Florida) 2021.
16. Kagan H. M., Li W.: Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. J. Cell. Biochem. 88, 660 (2003).

17. Rosa A. C., Corsi D., Cavi N., Bruni N., Dosio F.: Superoxide Dismutase Administration: A Review of Proposed Human Uses. *Molecules* 26, 1844 (2021).
18. Burkhead J. L., Collins J. F.: Nutrition Information Brief - Copper. *Adv. Nutr.* 13, 681 (2021).
19. Bost M., Houdart S., Oberli M., Kalonji E., Huneau J. F., Margaritis I.: Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 35, 107 (2016).
20. Chen L., Min J., Wang F.: Copper homeostasis and cuproptosis in health and disease. *Signal Transduct. Target. Ther.* 7, 378 (2022).
21. Rondanelli M., Faliva M. A., Infantino V., Gasparri C., Iannello G., Perna S., Riva A., Petrangolini G., Tartara A., Peroni G.: Copper as Dietary Supplement for Bone Metabolism: A Review. *Nutrients* 13, 2246 (2021).
22. de Romaña D. L., Olivares M., Uauy R., Araya M.: Risks and benefits of copper in light of new insights of copper homeostasis. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 25, 3 (2011).
23. Hordyjewska A., Popiołek Ł., Kocot J.: The many “faces” of copper in medicine and treatment. *Biometals* 27, 611 (2014).
24. Sharp P. A.: Ctr1 and its role in body copper homeostasis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35, 288 (2003).
25. Lutsenko S., Bhattacharjee A., Hubbard A. L.: Copper handling machinery of the brain. *Metallomics* 2, 596 (2010).
26. Maryon E. B., Molloy S. A., Zimnicka A. M., Kaplan J. H.: Copper entry into human cells: progress and unanswered questions. *Biometals* 20, 355 (2007).
27. Bhattacharjee A., Chakraborty K., Shukla A.: Cellular copper homeostasis: current concepts on its interplay with glutathione homeostasis and its implication in physiology and human diseases. *Metallomics* 9, 1376 (2017).
28. Calvo J., Jung H., Meloni G.: Copper metallothioneins. *IUBMB Life* 69, 236 (2017).
29. Chu C. C., Lee W. C., Guo W. Y., Pan S. M., Chen L. J., Li H. M., Jinn T. L.: A copper chaperone for superoxide dismutase that confers three types of copper/zinc superoxide dismutase activity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 139, 425 (2005).
30. Maxfield A. B., Heaton D. N., Winge D. R.: Cox17 is functional when tethered to the mitochondrial inner membrane. *J. Biol. Chem.* 279, 5072 (2004).
31. Michniewicz F., Saletta F., Rouaen J. R. C., Hewavisenti R. V., Mercatelli D., Cirillo G., Giorgi F. M., Trahair T., Ziegler D., Vittorio O.: Copper: An Intracellular Achilles’ Heel Allowing the

- Targeting of Epigenetics, Kinase Pathways, and Cell Metabolism in Cancer Therapeutics. *ChemMedChem* 16, 2315 (2021).
32. Royer A., Sharman T.: *Copper Toxicity*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL) 2022.
 33. Gaetke L. M., Chow-Johnson H. S., Chow C. K.: Copper: toxicological relevance and mechanisms. *Arch. Toxicol.* 88, 1929 (2014).
 34. Bisaglia M., Bubacco L.: Copper Ions and Parkinson's Disease: Why Is Homeostasis So Relevant? *Biomolecules.* 10, 195 (2020).
 35. Olivares M., Uauy R.: Copper as an essential nutrient. *Am. J. Clin. Nutr.* 63, 791S (1996).
 36. Gaetke L. M., Chow C. K.: Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology* 189, 147 (2003).
 37. Berenshtein E., Vaisman B., Goldberg-Langerman C., Kitrossky N., Konijn A. M., Chevion M.: Roles of ferritin and iron in ischemic preconditioning of the heart. *Mol. Cell. Biochem.* 234/235, 283 (2002).
 38. Jomova K., Valko M.: . Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 283, 65 (2011).
 39. Tapiero H., Townsend D. M., Tew K. D.: Trace elements in human physiology and pathology. *Copper. Biomed. Pharmacother.* 57, 386 (2003).
 40. Uriu-Adams J. Y., Keen C. L.: Copper, oxidative stress, and human health. *Mol. Aspects. Med.* 26, 268 (2005).
 41. Tümer Z., Møller L.: Menkes disease. *Eur. J. Hum. Genet.* 18, 511 (2010).
 42. Brewer G. J.: Copper in medicine. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7, 207 (2003).
 43. Ojha R., Prasad A. N.: Menkes disease: what a multidisciplinary approach can do. *J. Multidiscip. Healthc.* 17, 371 (2016).
 44. Członkowska A., Litwin T., Dusek P., Ferenci P., Lutsenko S., Medici V., Rybakowski J. K., Weiss K. H., Schilsky M. L.: Wilson disease. *Nat. Rev. Dis. Primers* 4, 21 (2018).
 45. Chaudhry H. S., Anilkumar A. C.: *Wilson Disease*. StatPearls Publishing, Treasure Island (Florida) 2022.
 46. Huster D.: Wilson disease. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 24, 531 (2010).
 47. Guindi M.: Wilson disease. *Semin. Diagn. Pathol.* 36, 415 (2019).
 48. Montes S., Rivera-Mancia S., Diaz-Ruiz A., Tristan-Lopez L., Rios C.: Copper and copper proteins in Parkinson's disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014, 147251 (2014).

49. Li Y., Yang C., Wang S., Yang D., Zhang Y., Xu L., Ma L., Zheng J., Petersen R. B., Zheng L., Chen H., Huang K.: Copper and iron ions accelerate the prion-like propagation of α -synuclein: A vicious cycle in Parkinson's disease. *Int. J. Biol. Macromol.* *163*, 562 (2020).
50. Balestrino R., Schapira A. H. V.: Parkinson disease. *Eur. J. Neurol.* *27*, 27 (2020).
51. Kumar A., Sidhu J., Goyal A., Jack W. T.: *Alzheimer Disease*. StatPearls Publishing, Treasure Island (Florida) 2022.
52. Vaz M., Silvestre S.: Alzheimer's disease: Recent treatment strategies. *Eur. J. Pharmacol.* *887*, 173554 (2020).
53. Bagheri S., Squitti R., Haertlé T., Siotto M., Saboury A. A.: Role of Copper in the Onset of Alzheimer's Disease Compared to Other Metals. *Front. Aging Neurosci.* *9*, 446 (2018).
54. Kang Y. J.: Copper and homocysteine in cardiovascular diseases. *Pharmacol. Ther.* *129*, 321 (2011).
55. DiNicolantonio J. J., Mangan D., O'Keefe J. H.: Copper deficiency may be a leading cause of ischaemic heart disease. *Open Heart* *5*, e000784 (2018).
56. Baldari S., Di Rocco G., Toietta G.: Current Biomedical Use of Copper Chelation Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* *21*, 1069 (2020).
57. Adam M. P., Everman D. B., Mirzaa G. M., Pagon R. A., Wallace S. E., Bean L. J. H., Gripp K. W., Amemiya A. (Eds): *Aceruloplasminemia*. University of Washington, Seattle, 1993.
58. Liu W., Feng Y., Yu S., Fan Z., Li X., Li J., Yin H.: The Flavonoid Biosynthesis Network in Plants. *Int. J. Mol. Sci.* *22*, 12824 (2021).
59. Martens S., Mithöfer A.: Flavones and flavone synthases. *Phytochemistry.* *66*, 2399 (2005).
60. Dias M. C., Pinto D. C. G. A., Silva A. M. S.: Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity. *Molecules* *26*, 5377 (2021).
61. Panche A. N., Diwan A. D., Chandra S. R.: Flavonoids: an overview. *J. Nutr. Sci.* *5*, e47 (2016).
62. Ullah A., Munir S., Badshah S. L., Khan N., Ghani L., Poulson B. G., Emwas A. H., Jaremko M.: Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent. *Molecules* *25*, 5243 (2020).
63. Kozłowska A., Szostak-Węgierek D.: Targeting Cardiovascular Diseases by Flavonols: An Update. *Nutrients* *14*, 1439 (2022).
64. Pabich M., Materska M.: Biological Effect of Soy Isoflavones in the Prevention of Civilization Diseases. *Nutrients* *20*, 1660 (2019).

65. Akinwumi B. C., Bordun K. M., Anderson H. D.: Biological Activities of Stilbenoids. *Int. J. Mol. Sci.* *19*, 792 (2018).
66. Teka T., Zhang L., Ge X., Li Y., Han L., Yan X.: Stilbenes: Source plants, chemistry, biosynthesis, pharmacology, application and problems related to their clinical Application-A comprehensive review. *Phytochemistry* *197*, 113128 (2022).
67. Das S., Khan N., Mukherjee S., Bagchi D., Gurusamy N., Swartz H., Das D. K.: Retraction notice to “Redox regulation of resveratrol-mediated switching of death signal into survival signal” [FRB 44 (2009) 82–90]. *Free Radic. Biol. Med.* *53*, 642 (2012).
68. Rudrapal M., Khan J., Dukhyil A. A. B., Alarousy R. M. I. I., Attah E. I., Sharma T., Khairnar S. J., Bendale A. R.: Chalcone Scaffolds, Bioprecursors of Flavonoids: Chemistry, Bioactivities, and Pharmacokinetics. *Molecules* *26*, 7177 (2021).
69. Mazziotti I., Petrarolo G., La Motta C.: Aurones: A Golden Resource for Active Compounds. *Molecules* *27*, 2 (2021).
70. Alsayari A., Muhsinah A. B., Hassan M. Z., Ahsan M. J., Alshehri J. A., Begum N.: Aurone: A biologically attractive scaffold as anticancer agent. *Eur. J. Med. Chem.* *166*, 417 (2019).
71. Mena P., Domínguez-Perles R., Gironés-Vilaplana A., Baenas N., García-Viguera C., Villaño D.: Flavan-3-ols, anthocyanins, and inflammation. *IUBMB Life* *66*, 745 (2014).
72. Márquez Campos E., Stehle P., Simon M. C.: Microbial Metabolites of Flavan-3-Ols and Their Biological Activity. *Nutrients* *11*, 2260 (2019).
73. Khoo H. E., Azlan A., Tang S. T., Lim S. M.: Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food Nutr. Res.* *61*, 1361779 (2017).
74. Hostetler G. L., Ralston R. A., Schwartz S. J.: Flavones: Food Sources, Bioavailability, Metabolism, and Bioactivity. *Adv. Nutr.* *8*, 423 (2017).
75. Perez-Vizcaino F., Duarte J.: Flavonols and cardiovascular disease. *Mol. Aspects Med.* *31*, 478 (2010).
76. Cassidy A., Minihane A. M.: The role of metabolism (and the microbiome) in defining the clinical efficacy of dietary flavonoids. *Am. J. Clin. Nutr.* *105*, 10 (2017).
77. Billowria K., Ali R., Rangra N. K., Kumar R., Chawla P. A.: Bioactive Flavonoids: A Comprehensive Review on Pharmacokinetics and Analytical Aspects. *Crit. Rev. Anal. Chem.* *54*, 1 (2022).

78. Murota K., Nakamura Y., Uehara M.: Flavonoid metabolism: the interaction of metabolites and gut microbiota. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **82**, 600 (2018).
79. Kumar S., Pandey A. K.: Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Sci. World J.* **2013**, 162750 (2013).
80. Heim K. E., Tagliaferro A. R., Bobilya D. J.: Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* **13**, 572 (2002).
81. Shen N., Wang T., Gan Q., Liu S., Wang L., Jin B.: Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. *Food Chem.* **383**, 132531 (2022).
82. Procházková D., Boušová I., Wilhelmová N.: Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* **82**, 513 (2011).
83. Stadler N., Lindner A. R., Davies M.: Direct Detection and Quantification of Transition Metal Ions in Human Atherosclerotic Plaques: Evidence for the Presence of Elevated Levels of Iron and Copper. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 949 (2004).
84. Berenshtein E., Vaisman B., Goldberg-Langerman C., Kitrossky N., Konijn A. M., Chevion M.: Roles of ferritin and iron in ischemic preconditioning of the heart. *Mol. Cell. Biochem.* **234**, 283 (2002).
85. Ambrosio G., Zweier J. L., Jacobus W. E., Weisfeldt M. L., Flaherty J. T.: Improvement of postischemic myocardial function and metabolism induced by administration of deferoxamine at the time of reflow: the role of iron in the pathogenesis of reperfusion injury. *Circulation* **76**, 906 (1987).
86. Strain J. J.: Newer aspects of micronutrients in chronic disease: copper. *Proc. Nutr. Soc.* **53**, 583 (1994).
87. Jucá M. M., Cysne Filho F. M. S., de Almeida J. C., Mesquita D. D. S., Barriga J. R. M., Dias K. C. F., Barbosa T. M., Vasconcelos L. C., Leal L. K. A. M., Ribeiro J. E., Vasconcelos S. M. M.: Flavonoids: biological activities and therapeutic potential. *Nat. Prod. Res.* **34**, 692 (2020).
88. Maleki S. J., Crespo J. F., Cabanillas B.: Anti-inflammatory effects of flavonoids. *Food Chem.* **299**, 125124 (2019).
89. Biharee A., Sharma A., Kumar A., Jaitak V.: Antimicrobial flavonoids as a potential substitute for overcoming antimicrobial resistance. *Fitoterapia* **146**, 104720 (2020).

90. Del Olmo A., Calzada J., Nuñez M.: Benzoic acid and its derivatives as naturally occurring compounds in foods and as additives: Uses, exposure, and controversy. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* *57*, 3084 (2017).
91. Juurlink B. H. J., Azouz H. J., Aldalati A.M., AlTinawi B. M. H., Ganguly P.: Hydroxybenzoic acid isomers and the cardiovascular system. *Nutr. J.* *13*, 63 (2014).
92. National Library of Medicine. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4-Hydroxybenzoic-acid>, stiahnuté 22.12.2022.
93. Riddick E. W., Wu Z., Eller F. J., Berhow M. A.: Potential of 2,4-Dihydroxybenzoic Acid as an Oviposition Stimulant for Mass-Reared Ladybird Beetles. *J. Insect Sci.* *19*, 9 (2019).
94. Cirak C., Radusiene J., Jakstas V., Ivanauskas L., Seyis F., Yayla F.: Secondary metabolites of seven *Hypericum* species growing in Turkey. *Pharm. Biol.* *54*, 2244 (2016).
95. Zenkevich I. G., Eshchenko A. Y., Makarova S. V., Vitenberg A. G., Dobryakov Y. G., Utsal V. A.: Identification of the products of oxidation of quercetin by air oxygen at ambient temperature. *Molecules* *12*, 654 (2007).
96. Gao K., Xu A., Krul C., Venema K., Liu Y., Niu Y., Lu J., Bensoussan L., Seeram N. P., Heber D., Henning S. M.: Of the major phenolic acids formed during human microbial fermentation of tea, citrus, and soy flavonoid supplements, only 3,4-dihydroxyphenylacetic acid has antiproliferative activity. *J. Nutr.* *136*, 25 (2006).
97. The Human Metabolome Database. Dostupné z: <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0000714>, stiahnuté 19.12.2022.
98. Mladenka P., Zatloukalová L., Filipský T., Hrdina R.: Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radic. Biol. Med.* *49*, 963 (2010).
99. Lomozová Z., Hrubša M., Conte P. F., Papastefanaki E., Moravcová M., Catapano M. C., Proietti Silvestri I., Karlíčková J., Kučera R., Macáková K., Mladěnka P.: The effect of flavonoids on the reduction of cupric ions, the copper-driven Fenton reaction and copper-triggered haemolysis. *Food Chem.* *394*, 133461 (2022).
100. Del Rio D., Rodriguez-Mateos A., Spencer J. P., Tognolini M., Borges G., Crozier A.: Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid. Redox Signal.* *18*, 1818 (2013).
101. Seeram N. P., Bourquin L. D., Nair M. G. Degradation products of cyanidin glycosides from tart cherries and their bioactivities. *J. Agric. Food Chem.* *49*, 4924 (2001).

102. Kim D. H., Jung E. A., Sohng I. S., Han J. A., Kim T. H., Han M. J.: Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities. *Arch. Pharm. Res.* **21**, 17 (1998).
103. Moazzen A., Öztinen N., Ak-Sakalli E., Koşar M.: Structure-antiradical activity relationships of 25 natural antioxidant phenolic compounds from different classes. *Heliyon.* **8**, e10467 (2022).
104. Beauchamp CH., Fridovich I.: Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* **44**, 276 (1971).
105. Velika B., Kron I.: Antioxidant properties of benzoic acid derivatives against Superoxide radical. *Free Rad. Antiox.* **2**, 62 (2012).
106. Mansouri A., Makris D. P., Kefalas P.: Determination of hydrogen peroxide scavenging activity of cinnamic and benzoic acids employing a highly sensitive peroxyoxalate chemiluminescence-based assay: structure-activity relationships. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **39**, 22 (2005).
107. Sharma S., Toppo A., Rath B., Harbhajanka A., Lalita Jyotsna P.: Hemolytic Anemia as a Presenting Feature of Wilson's Disease: A Case Report. *Indian J. Hematol. Blood Transfus.* **26**, 101 (2010).
108. Kudva A. K., Raghu S. V., Achar P. K., Rao S., Suresh S., Shrinath Baliga M.: Study of Serum Zinc and Copper Levels and Tumor Pathology: A Pilot Study in People Affected with Head and Neck Cancers. *Indian J. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **74**, 6007 (2022).