

**UNIVERZITA KARLOVA**

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



**VPLYV BENZOOVÝCH KYSELÍN, METABOLITOV FLAVONOIDOV,  
NA ŽELEZOM KATALYZOVANÚ FENTONOVU REAKCIU**

Diplomová práce

Vedúci diplomovej práce: prof. PharmDr. Přemysl Mladěnka, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Zuzana Lomozová, Ph.D.

Hradec Králové 2023

Alexandra Klenovičová

## **Prehlásenie**

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom, ktoré som vypracovala samostatne. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Táto práca nebola použitá k získaniu iného či rovnakého titulu.“

V Hradci Králové, dňa 27.04.2023

Alexandra Klenovičová

## **Pod'akovanie**

Rada by som sa poďakovala vedúcemu diplomovej práce prof. PharmDr. Přemyslovi Mladěnkovi, Ph.D. za jeho odborné vedenie, profesionálny prístup, cenné rady a vecné pripomienky. Moja vďaka taktiež patrí Mgr. Zuzane Lomozovej, Ph.D. za jej obetavú pomoc, spoluprácu, čas a dôležité rady, či už v laboratóriu alebo mimo neho. V neposlednom rade sa chcem poďakovať nebohej doc. Ing. Kateřine Macákovej, Ph.D. za vytvorenie príležitosti v podobe tejto diplomovej práce.

# Obsah

1. Abstrakt.....	7
2. Abstract .....	9
3. Cieľ práce.....	11
4. Teoretická časť.....	12
5.1. Flavonoidy .....	12
5.1.1. Úvod.....	12
5.1.2. História flavonoidov .....	12
5.1.3. Chemická štruktúra flavonoidov .....	13
5.1.4. Klasifikácia .....	14
5.1.6. Metabolizmus flavonoidov u ľudí.....	22
5.1.7. Metabolizmus flavonoidov v strednej časti tráviacej sústavy.....	22
5.1.8. Kolonický metabolizmus flavonoidov .....	23
5.1.9. Výskyt v rastlinách .....	26
5.2. Klinické vlastnosti flavonoidov .....	26
5.2.1. Úvodný prehľad .....	26
5.2.2. Antioxidačné vlastnosti flavonoidov .....	27
5.2.3. Prooxidačná aktivita.....	29
5.2.4. Protizápalová aktivita.....	31
5.2.5. Antihypertenzná aktivita .....	31
5.2.6. Protidoštičková aktivita .....	34
5.2.7. Hypolipidemická aktivita.....	35
5.2.8. Antihyperglykemická aktivita.....	36
5.3. Metabolity flavonoidov .....	36
5.3.1. Účinky fenolových kyselín <i>in vitro</i> a <i>in vivo</i> .....	36
5.3.2. Antioxidačná aktivita fenolových kyselín .....	37
5.3.3. Príklady zástupcov fenolových kyselín s antioxidačnými vlastnosťami .....	37
5.3.4. Antihypertenzné účinky fenolových kyselín.....	39
5.3.5. Vplyv na ichemické ochorenia srdca .....	40
5.3.6. Antiaterogénne účinky metabolitov .....	41
5.3.7. Protizápalové účinky metabolitov.....	41
5.3.8. Antihyperglykemický účinok metabolitov.....	42
5.3.9. Vplyv na karcinóm hrubého čreva a iné karcinómy .....	42
5.3.10. Antimikrobiálne účinky metabolitov .....	43

5.4. Železo .....	44
5.4.1. Železo ako esenciálny prvok v ľudskom organizme.....	44
5.4.2. Kinetika železa v organizme .....	44
5.4.3. Regulácia homeostázy .....	46
5.4.4. Ochorenia .....	47
5.4.5. Fentonova reakcia a železo .....	47
5.4.6. Chelatácia železa.....	49
5.4.7 Flavonoidy a chelatácia železa.....	49
6. Experimentálna časť .....	51
6.1. Použité prístroje, pomôcky a chemikálie.....	51
6.1.1. Prístroje .....	51
6.1.2. Pomôcky .....	51
6.1.3. Chemikálie .....	51
6.1.4. Chemikálie na prípravu pufrov .....	52
6.1.5. Ďalšie látky .....	52
6.1.6. Rozpúšťadlá .....	52
6.2. Metodika práce .....	53
6.2.1. Príprava zásobných roztokov .....	53
6.2.2. Príprava roztokov využitých v experimente .....	53
6.2.3. Príprava mobilnej fázy .....	54
6.2.4. Priebeh experimentu .....	54
6.2.5. Matematické a štatistické vyhodnotenie .....	56
7. Výsledky.....	57
7.1. Vplyv kyseliny benzoovej na železom katalyzovanú Fentonovu reakciu.....	57
7.2. Vplyv kyseliny 3-hydroxybenzoovej na železom katalyzovanú Fentonovu reakciu ....	58
7.3. Vplyv kyseliny 4-hydroxybenzoovej na železom katalyzovanú Fentonovu reakciu ....	58
7.4. Vplyv kyseliny 2,4- dihydroxybenzoovej na železom katalyzovanú Fentonovu reakciu .....	59
7.5. Vplyv kyseliny 3,4- dihydroxybenzoovej na železom katalyzovanú Fentonovu reakciu .....	60
7.6. Vplyv kyseliny 2,4,6-trihydroxybenzoovej na železom katalyzovanú Fentonovu reakciu .....	61
7.7. Vplyv kyseliny 2-hydroxy-4-methoxybenzoová na železom katalyzovanú Fentonovu reakciu .....	62
7.8. Vplyv kyseliny benzoylaminooctovej na železom katalyzovanú Fentonovu reakciu ...	63
8. Diskusia.....	65

9. Závěr.....	69
10. Použité skratky .....	70
11. Použitá literatura .....	71

# 1. Abstrakt

**Univerzita Karlova**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra farmakologie a toxikologie**

**Študentka:** Alexandra Klenovičová

**Školiteľ:** prof. PharmDr. Přemysl Mladěnka, Ph.D.

**Konzultant:** Mgr. Zuzana Lomozová, Ph.D.

**Názov diplomovej práce:** Vplyv benzoových kyselín, metabolitov flavonoidov, na železom katalyzovanú Fentonovu reakciu

Oxidačný stres je stav, kedy dochádza k zvýšenej produkcii voľných radikálov, ktoré prekročili endogénnu antioxidačnú aktivitu a vedú k poškodeniu biomolekúl. Rada ľudských ochorení je spojovaná s oxidačným stresom. Použitie antioxidantov ale v klinickej praxi zlyhalo, je možné, že sa na tom podieľa i fakt, že v prípade zvýšenej koncentrácie antioxidantu, alebo pri rôznych patofyziologických stavoch organizmu môžu antioxidanty vykazovať preferenčne prooxidačnú aktivitu. Rôzne *in vitro* a epidemiologické štúdie potvrdili prítomnosť antioxidačných a prooxidačných vlastností u flavonoidov. Avšak na základe ich farmakokinetiky je zjavné, že po perorálnom príjme týchto látok dochádza k významnému metabolizmu v hrubom čreve, kedy v interakcii s črevnou mikroflórou vznikajú malé fenolické látky. Naskytá sa tu možnosť, že antioxidačné a rizikové prooxidačné vlastnosti, ktoré boli pripisované flavonoidom sú v skutočnosti vlastnosťou ich metabolitov. V našej práci sme sa venovali práve k identifikácii týchto vlastností u derivátov benzoovej kyseliny za pomoci železitými iónmi indukovanej Fentonovej reakcie a HPLC meraním sme preukázali zvýšenú resp. zníženú produkciu hydroxylových radikálov. Celkom bolo otestovaných 8 metabolitov s benzoovým jadrom za 2 pH podmienok. V prípade prítomnosti dvoch hydroxyskupín v molekule látky (kyselina 2,4-dihydroxybenzoová a kyselina 3,4-dihydroxybenzoová) dochádzalo k prejavom antioxidačnej aktivity. Navýšenie počtu hydroxyskupín u kyseliny 2,4,6-trihydroxybenzoovej nezvýšilo

antioxidačnú aktivitu, látka naopak prejavovala prooxidačnú aktivitu. V prípade neprítomnosti hydroxyskupiny v molekule, (kyselina benzoová, kyselina benzoylaminoctová) látka neprejavovala preferenčne ani antioxidačnú, ani prooxidačnú aktivitu. Analogicky, látky s jednou hydroxyskupinou (3-hydroxybenzoová a 4-hydroxybenzoová kyselina) mali taktiež neutrálny vplyv na túto reakciu. Táto práca poukázala na významné rozdiely v anti- a prooxidačných pôsobeniach testovaných látok, ktoré je treba vzhľadom na *in vitro* charakteru tejto diplomovej práce, overiť taktiež v *in vivo* podmienkach.



## 2. Abstract

**Charles University**

**Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department of Pharmacology & Toxicology**

**Student:** Alexandra Klenovičová

**Supervisor:** Prof. Přemysl Mladěnka, PharmDr., Ph.D.

**Consultant:** Zuzana Lomozová, Ph.D.

**Title of diploma thesis:** The impact of benzoic acids, metabolites of flavonoids, on the iron-catalysed Fenton reaction

Oxidative stress is a condition in which there is an increased production of free radicals that exceeds endogenous antioxidant activity and leads to damage of biomolecules. A number of human diseases are associated with oxidative stress. However the use of antioxidants has failed in clinical trials, but it is possible that the fact that antioxidants may preferentially exhibit prooxidant activity under elevated antioxidant concentrations in various pathophysiological conditions. Various *in vitro* and epidemiological studies have confirmed the presence of antioxidant and prooxidant properties in flavonoids. However, on the basis of their pharmacokinetics, it is evident that after their oral intake, significant metabolism in the colon takes place, where small phenolic substances are formed in interaction with the intestinal microflora. There is a possibility that the antioxidant and harmful prooxidant properties that have been attributed to flavonoids are in fact a characteristic of their metabolites. In our work, we have focused specifically on the investigation of these properties in benzoic acid derivatives using the ferric ion-induced Fenton reaction. Increased and decreased hydroxyl radical production, respectively, was demonstrated by HPLC measurements. A total of 8 benzoic metabolites were tested under 2 pH conditions. In substances containing two free hydroxyl groups (2,4-dihydroxybenzoic acid and 3,4-dihydroxybenzoic acid), there was a manifestation of antioxidant activity. Additional hydroxyl groups in the case of 2,4,6-trihydroxybenzoic acid did not increase the

antioxidant activity, on the contrary, the substance showed prooxidant activity. In the absence of a hydroxy group in the molecule, (benzoic acid, benzoylaminoacetic acid), neither antioxidant nor prooxidant activity was observed. Analogously, substances with one hydroxy group (3-hydroxybenzoic and 4-hydroxybenzoic acid) also had a neutral effect on this reaction. This work showed significant differences in the anti- and prooxidant activities of the tested substances, which, due to the *in vitro* nature of this thesis, need to be verified also under *in vivo* conditions.

### 3. Cieľ práce

Cieľom tejto diplomovej práce bolo preskúmať antioxidačné, prípadne prooxidačné vlastnosti metabolitov flavonoidov, presnejšie benzoových kyselín, ktoré vznikajú interakciou s bakteriálnou mikroflórou v hrubom čreve. Náplňou práce bolo zistiť tieto vlastnosti na základe vplyvu benzoových kyselín na železitými iónmi indukovanú Fentonovu reakciu s následnou indukciou alebo inhibíciou produkcie voľných radikálov pomocou HPLC merania. Pre analýzu boli vybrané 2 pH podmienky: pH 7,5, teda pH blízke neutrálnemu pH, a taktiež pH 4,5, ktoré imituje výraznú acidózu, pH lyzozómov a taktiež pH, ktoré môže byť pozorované v žalúdku.

## **4. Teoretická časť**

### **5.1. Flavonoidy**

#### **5.1.1. Úvod**

Flavonoidy považujeme za jednu z najdôležitejších skupín zlúčenín, ktoré sa vyskytujú u vyšších rastlín. S počtom viac ako 10 000 doposiaľ objavených flavonoidov ich zaradujeme medzi jednu z najrozšírenejších skupín rastlinných látok. Spoločne s fenolovými kyselinami, lignanmi, tanínmi a stilbenmi spadajú medzi sekundárne (poly)fenolické metabolity rastlín. Popísané sú ich antioxidačné, antihypertenzné, protikancerogénne, antiangiogénne, antimikrobiálne, protivírusové, ale aj antimalarické účinky. (Ullah et al. 2020)

Flavonoidy sú vo veľkej miere obsiahnuté v zelenine, ovocí a v čaji. Pre človeka je denný príjem flavonoidov v rozmedzí od 150 mg až do 600 mg v závislosti na regióne a diétnom štýle jednotlivca, ktoré sa celosvetovo výrazne líšia. Príkladom je Veľká Británia, kde sa konzumáciou čierneho čaju zvyšuje celkový príjem flavonoidov, kedy sa toto číslo vo výsledku pohybuje v rozpätí od 500 do 1000 mg. (Escobar-Cévoli et al. 2017)

#### **5.1.2. História flavonoidov**

Za objaviteľa flavonoidov považujeme Alberta Szent-Györgyi. Tento významný maďarský biochemik sa narodil v Budapešti 16.9. 1893 a zomrel 22.10. 1986 vo Woods Hole, v štáte Massachusetts, v Spojených štátoch amerických. Počas svojho života za zaslúžil o mnoho objavov, medzi ktoré patria izolovanie redukujúcej látky z nadobličiek, ktorá bola neskôr identifikovaná ako vitamín C. Preukázal taktiež existenciu redukujúcich látok v rastlinných pletivách, a aj v živočíšnych tkanivách. Jeho štúdium biologických oxidačných javov viedlo k rozpoznaní katalytických vlastností C4-dikarboxylových kyselín, objavu flavínu a k popisu jeho biologickej aktivity. Taktiež popísal vitamínovú povahu flavanonu, ktorý označil za vitamín P. Jeho celoživotné úsilie ho doviedlo až k získaniu Nobelovej ceny za fyziológiu a medicínu v roku 1937, ktorá mu bola udelená za biologické procesy s osobitým dôrazom na vitamín C. (Protivová 2006)

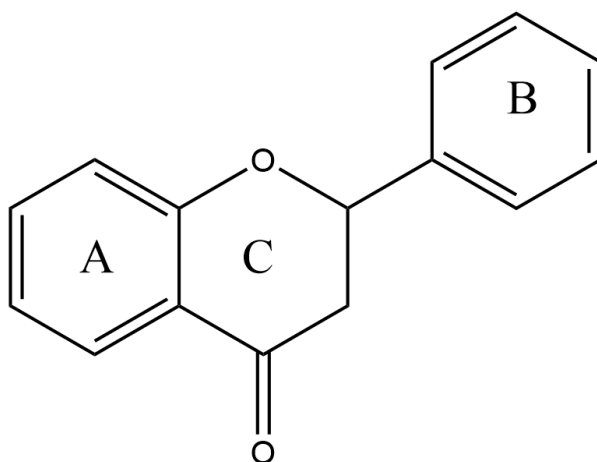
### 5.1.3. Chemická štruktúra flavonoidov

Flavonoidy sa na základe svojej chemickej štruktúry zaraďujú do skupiny polyfenolických látok. Vo svojej molekule obsahujú 15 uhlíkov, ktoré vytvárajú skelet flavonoidu C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. (Sharma et al. 2019)

Uhlíky tvoria benzopyrón s dvomi aromatickými kruhmi, ktoré označujeme ako kruh A a kruh B. Tieto aromatické kruhy sú navzájom spojené cez heterocyklický pyránový kruh, označený ako kruh C (viz Obr. 1). (Kaushal et al. 2022)

Flavonoidy môžeme rozdeliť do celej rady kategórií, a to na základe stupňa sýtosti heterocyklického kruhu, polohy kruhu C, prítomnosti nenasýtenej väzby medzi polohami 2 a 3 a prítomnosti hydroxylovej skupiny v polohe 3. Príkladom nenasýtených flavonoidov sú flavóny, flavonoly, izoflavóny, na druhej strane medzi nasýtené flavonoidy radíme flavanóny, dihydroflavonoly a flavan-3-oly. (Dias et al. 2021)

Ďalší spôsob akým môžeme deliť flavonoidy je na základe ich väzby na cukor. Flavonoidy, ktoré sú vo voľnej forme, čiže vo svojej molekule neobsahujú cukor, sú označované ako aglykóny. Majoritné množstvo flavonoidov sa však v prírode nachádza vo forme glykozylovaných flavonoidov, kedy najrozšírenejšie sú flavonoidné O-glykozidy, ale samozrejme môžeme nájsť aj flavonoidy viazané vo forme C-glykozidov. Práve prítomnosť cukrového zvyšku mení fyzikálne a chemické vlastnosti látky, a to najmä zlepšenie rozpustnosti vo vode. Methylácia naopak zlepšuje vstup flavonoidov do buniek. (Dias et al. 2021)

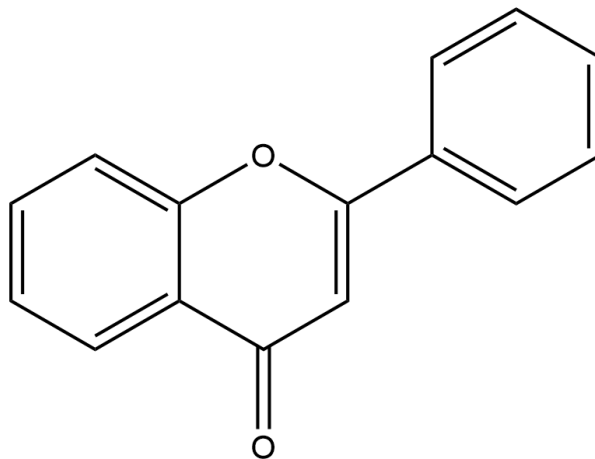


Obr. 1 Všeobecná štruktúra flavonoidu

#### 5.1.4. Klasifikácia

**Flavóny** - Sú jedna z najdôležitejších skupín spomedzi všetkých flavonoidov, hoci je ich výskyt v ľudskej strave malý, najmä v porovnaní s inými podskupinami ako flavonoly a flavanoly. Vo svojej štruktúre majú obsiahnutú dvojitú väzbu a na C4 lokalizovanú ketónovú skupinu (viz Obr. 2) Väčšina flavónov sú 7-O-glykozidy. (Shen et al. 2022)

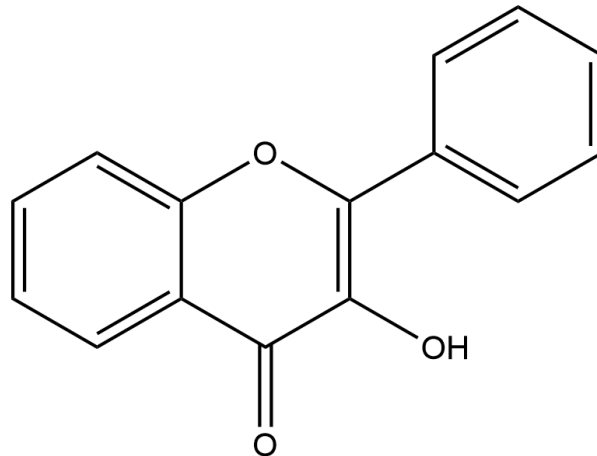
Typicky sa nachádzajú v červenej paprike, pažitke, zeleri, cibule, oregane, bazalke, tymiane alebo v pomarančoch. Zástupcovia tejto skupiny flavonoidov sú napríklad luteolín, apigenín, tangerín, nobiletín. Ich účinky sú rozsiahlo skúmané na rôzne možné indikácie. Napríklad apigenín vyvoláva zastavenie bunkového cyklu v rôznych štádiách proliferácie, G1/S-fázy alebo aj G2/M fázy, moduluje expresiu rôznych génov a indukuje apoptózu buniek. (Salehi et al. 2019)



Obr. 2 Všeobecná štruktúra flavónu

**Flavonoly** - typická je pre flavonoly prítomnosť 3-hydroxylovej skupiny súčasne s 4-ketoskupinou a dvojitou väzbou v polohe 2-3. (viz Obr. 3). Do tejto podskupiny flavonoidov zaradujeme látky ako je kempferol, kvercetín, myricetín, ktoré sú taktiež jednými z najštudovanejších látok medzi flavonoidmi. Zaujímavé je, že na základe polohy pripojeného cukrového zvyšku môžeme rozlíšiť zdroje kvercetínu. Zatiaľ čo kvercetín-4'-glukozid sa

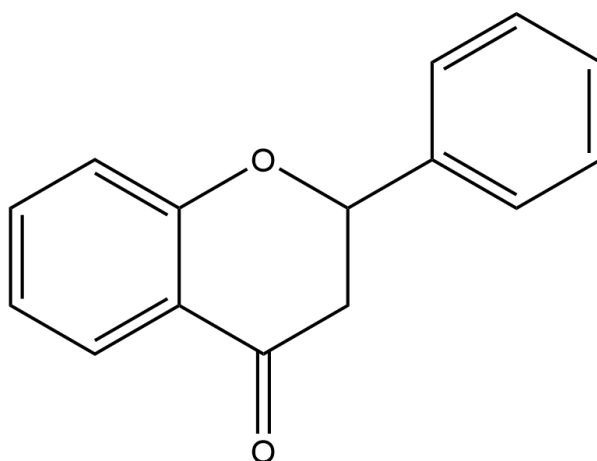
nachádza v cibule, tak kvercetín-3-glukozid môžeme nájsť v jablkách. Okrem ovocia a zeleniny je významným zdrojom flavonolov čaj a červené víno. Flavonoly sa vyznačujú antioxidačnou aktivitou, inhibíciou lipooxygenázy (LOX), inhibíciou NADPH (nikotínamidadenín-dinukleotidfosfát) oxidázy. Významná je u kemferolu aj antiproliferatívna aktivita. (Graefe et al. 1999; Mladěnka et al. 2010)



Obr. 3 Všeobecná štruktúra flavonolu

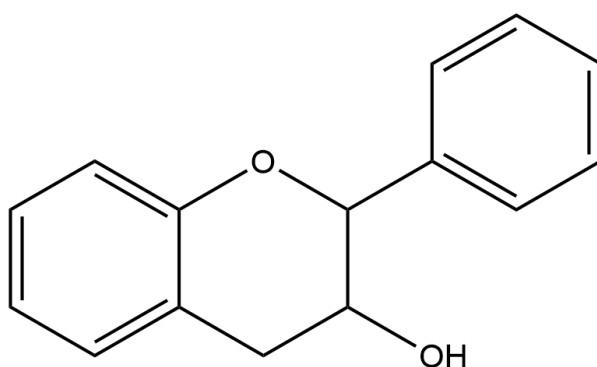
**Flavanóny** - Označujú sa aj ako dihydroflavóny (viz Obr. 4), alebo citrusové flavonoidy na základe ich vysokého výskytu v citrusových plodoch. Sú skupinou prítomnou vo všetkých citrusoch. Medzi ich významné vlastnosti patrí schopnosť zachytávať voľné radikály, čo ich radí medzi flavonoidy s antioxidačnými vlastnosťami, sú schopné znižovať hladinu cholesterolu v krvi a majú protizápalové vlastnosti. (Panche et al. 2016)

V prírode sa vyskytujú vo forme glykosidov, ale môžeme ich nájsť aj vo forme aglykónov. Glykosidy sú väčšinou disacharidy, kde cukrová zložka je naviazaná v polohe 7. Zaraďujeme sem neohesperidózu alebo rutinózu a aglykóny naringenín, hesperidín alebo eridiktyol. (Říhová 2008)



Obr. 4 Všeobecná štruktúra flavanónu

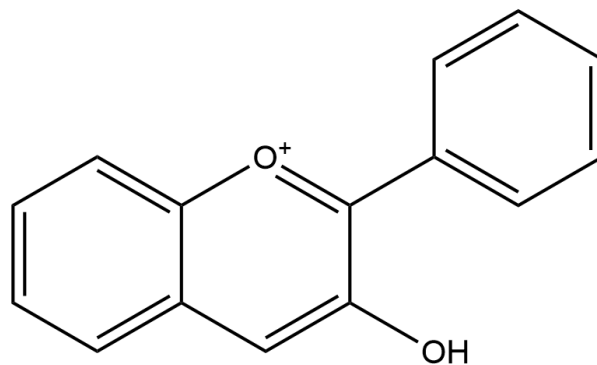
**Flavanoly** - Ich štruktúra vychádza z flavanu. Sú označované aj ako flavan-3-oly, čo znamená, že v ich molekule je prítomná hydroxylová skupina a to v pozícii C3 (viz Obr. 5). Je možné pozorovať určitú podobnosť so štruktúrou anthokyanidínov, ktoré na rozdiel od flavanolov majú kladný náboj a dvojitú väzbu na C kruhu. Flavanoly je možné nájsť buď ako monoméne štruktúry, ktoré označujeme názvom katechíny, alebo ako polyméry, známe ako proanthokyanidíny. Pričom rozdiel medzi katechínmi a epikatechínmi je na základe priestorovej orientácie hydroxylovej skupiny v polohe C3. Flavanoly sa vyskytujú v čaji, alebo taktiež v kakau. (Panche et al.2016; Říhová 2008)



Obr. 5 Všeobecná štruktúra flavanolu



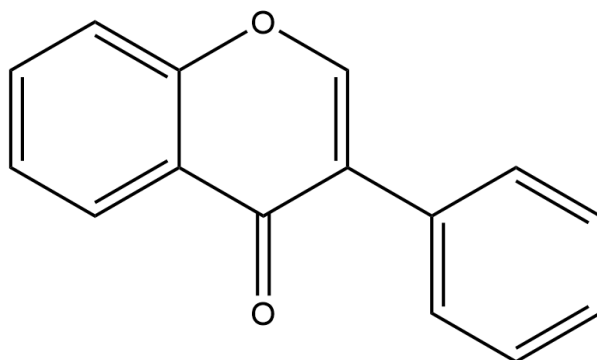
**Anthokyány** - Môžu existovať vo forme aglykónov (anthokyánov) (viz Obr. 6), alebo aj vo forme glykozilovaných anthokyanidínov. Táto podskupina je najviac zastúpená v pigmentoch zodpovedných za sfarbenie rastlinných kvetov a ovocia. Najčastejšie vyskytujúce sa monoméne anthokyány sú kyanidín, delfinidín, malvidín, pelargonidín, peonidín. Dodávajú charakteristické sfarbenie napríklad brusniciam, ríbezliam, červenému hroznu, malinám, jahodám alebo čučoriedkam. Farba ovocia alebo kvetov závisí od pH a od metylácie alebo acetylácie hydroxyskupiny na kruhu A a B. (Mattioli et. al. 2020; Panche et al. 2016)



Obr. 6 Všeobecná štruktúra anthokyánu

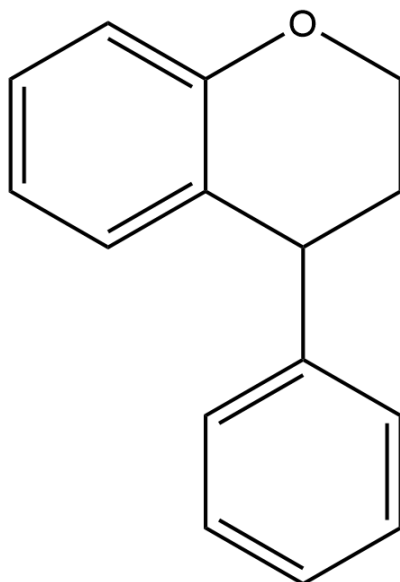
**Izoflavonoidy** - Štruktúrne sa od flavonoidov líšia polohou kruhu C, ktorý sa nachádza v pozícii 3 (viz Obr. 7). Táto skupina je významná svojou schopnosťou indukovať hormonálne a metabolické zmeny. Práve vďaka tejto vlastnosti sú izoflavonoidy označované ako fytoestrogény. Do skupiny izoflavonoidov patria látky ako genistein alebo daidzein. (Panche et al. 2016)

Medzi ich zdroje zaraďujeme sóju fazuľovú (*Glycine max*), ktorá je práve pre svoju biologické vlastnosti široko využívaná v terapii a zmierňovaní menopauzálnych príznakov. (Gao et al. 2006)



Obr. 7 Všeobecná štruktúra izoflavonoidu

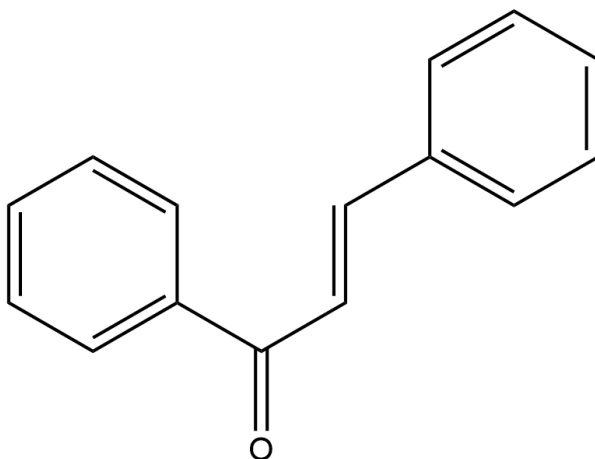
**Neoflavonoidy** - Sú známe aj pod označením flavanoidy. Prvým izolovaným neoflavonoidom bol kalofyloid v roku 1951. Zatiaľ čo flavonoidy majú štruktúru 2-fenylchromen-4-onu, neoflavonoidy sú 4-fenylchromenu bez hydroxylovej substitúcie v polohe 2 (viz Obr. 8). (Panche et al. 2016)



Obr. 8 Všeobecná štruktúra neoflavonoidu

**Chalkóny** - Ide o lipofilné štruktúry, ktoré pozostávajú z dvoch aromatických zvyškov navzájom prepojených karbonylovým systémom troch atómov uhlíka. (viz Obr. 9) (Constantinescu a Lungu 2021)

Vďaka absencii kruhu C sú typicky označované aj ako flavonoidy s otvoreným reťazcom. Zástupcovia tejto podskupiny sú floridzín a arbutín. (Panche et al. 2016)



Obr. 9 Všeobecná štruktúra chalkónu

### 3.1.5. Syntéza flavonoidov

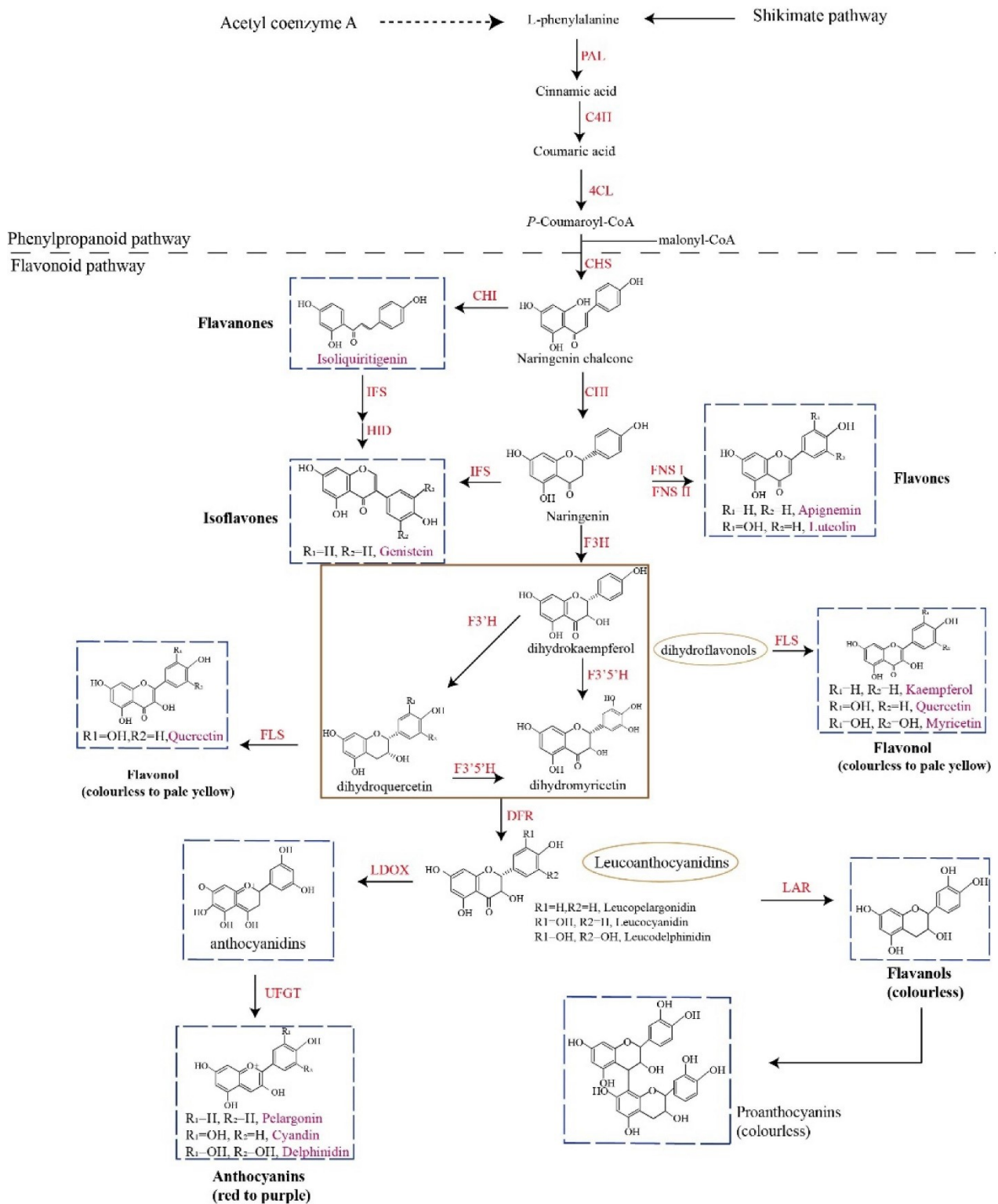
Flavonoidy sa v rastlinách tvoria vďaka dvom biosyntetickým dráham. Jednou z nich je fenylylpropanoidná dráha, počas ktorej dochádza k tvorbe fenylylpropanoidného skeletu flavonoidu C6-C3. Druhou dráhou je dráha polyketidová, inak označovaná ako šikimátová cesta, ktorá vytvára blok pre polymérne C2 jednotky. (Panche et al. 2016)

Počiatkový produkt šikimátovej cesty je fenylylalanín, z ktorého následne vzniká kyselina škoricová pôsobením enzýmu fenylylalanín amóniolyázová kataláza. Hydroxyláza kyseliny škoricovej hydroxyluje kyselinu škoricovú v polohe C4 a tým vzniká kyselina *p*-kumarová. Na túto kyselinu ďalej pôsobí kumarínová CoA (koenzým A) ligáza a to za vzniku *p*-kumaroyl CoA. Medzitým vo fenylylpropanoidnej dráhe vzniká malonyl CoA. (Shen et al. 2022)

Po vytvorení oboch substrátov, malonyl CoA aj *p*-kumaroyl CoA, na obe látky pôsobí chalkónsyntáza a kondenzačnou reakciou dochádza ku vzniku naringenínového chalkónu.

Naringenínový chakón je kľúčovým substrátom na produkciu celej škály flavonoidných skupín. Katalytickým pôsobením chalkónizomerázy dochádza ku vzniku flavanónov. Cyklizáciou chalkónového naringenínu zase vzniká naringenín. Naringenín v reakcii s flavónsyntázou I a II katalyzuje tvorbu flavónov, alebo pôsobením izoflavónsyntázy na naringenín môže vznikáť izoflavón. Vplyvom flavón-3-hydroxylázy na naringenín vzniká dihydrokvercetínu a dihydromyricetínu. Prehľadnú schému biosyntetických procesov je možné vidieť na obrázku 10. (Shen et al. 2022)

Samozrejme biosyntézu flavonoidov v rastlinách môžu ovplyvňovať aj vonkajšie faktory prostredia, ako je napríklad svetlo, miera zvlahy alebo teplota. Významný vplyv na biosyntézu flavonoidov majú aj hormóny, príkladom je kyselina jasmonová. Ďalej to môže byť fyzické zranenia rastlín, čo môže ovplyvniť mieru expresie génov, ktoré sú zapojené do biosyntézy. (Panche et al. 2016)



Obr. 10 Prehľad biosyntetických ciest jednotlivých tried flavonoidov

Prevzaté z: Shen et al. (2022)

### 5.1.6. Metabolizmus flavonoidov u ľudí

Celkovo vieme metabolizmus flavonoidov rozdeliť do dvoch komponentov. Prvý komponent je zložený zo žalúdka, tenkého čreva a pečene, zatiaľ čo do druhého komponentu zaradujeme hrubé črevo. (Kaushal et al. 2022)

### 5.1.7. Metabolizmus flavonoidov v strednej časti tráviacej sústavy

Väčšina flavonoidov existuje vo forme glykozidov a hoci má táto forma veľmi dobrú rozpustnosť vo vode a v žalúdočných šťavách, neoplýva schopnosťou jednoduchého transportu cez membrány. Dá sa teda povedať, že flavonoidy ťažko využijú svoju zlepšenú rozpustnosť v tejto časti kompartmentu, nakoľko sa ťažko vstrebávajú v kyslom prostredí, sú vo forme glykozidov a plocha žalúdočnej sliznice je malá. (Kaushal et al. 2022)

Ďalšou časťou prvého komponentu je tenké črevo. Vďaka veľkému absorpčnému povrchu sliznice tu dochádza k najväčšiemu vstrebávaniu nutrientov z potravy. Na povrchu epitelových buniek sa však nenachádzajú žiadne špecifické transportéry pre flavonoidy. V tomto úseky tráviacej sústavy, však asi dochádza k absorpcii niektorých flavonoidov pomocou pasívneho transportu skrz sodík-depedentný transportér označovaný ako SGLT-1. (Kaushal et al. 2022)

V prvom komponente metabolizmus sú lokalizované hydrolyzujúce a konjugačné enzýmy. Hydrolyzujúce enzýmy svojím pôsobením na niektoré flavonoidné glykozidy vytvárajú aglykóny, ktoré vie telo lepšie využiť. (Kaushal et al. 2022)

Mimo črevný kefový lem sa nachádza enzým laktáza florizín hydroláza, ktorý zabezpečuje vznik niektorých flavonoidných aglykónov. Ďalej v tenkom čreve prebieha odstránenie cukrovej skupiny  $\beta$ -glukozidáciou za vzniku menších hydrofóbných aglykónov. Nie všetky glykozidy, napr. rutín, sú ale ľudskými enzýmami metabolizovateľné na zodpovedajúce aglykóny. Okrem vstrebávania dochádza k tenkom čreve aj k effluxu flavonoidov späť do luménu čreva. Effluxované flavonoidy postupujú ďalej do tráviaceho traktu, kde podstupujú degradáciu. (Kaushal et al. 2022)

Proces effluxu prebieha prostredníctvom skupiny aktívnych effluxných transportérov súhrne označovaných ako ABC, ktoré sú prítomné na apikálnej časti epitelálnych buniek. Do tejto skupiny spadá P-gp (P glykoproteín, známy taktiež ako MRP 1, multidrug resistance multidrug resistance protein ), MRP 2 a BCRP (breast cancer resistance protein). (Skálová et al. 2013)

Na základe týchto faktov je jasné, že iba malá časť metabolitov transportovaných cez bazolaterálnu membránu a cez portálnu žilu prechádza do pečene, kde bude následne dochádzať k ďalším metabolickým procesom. Dva hlavné metabolické procesy, ktoré flavonoidy podstupujú v pečeni sú 1) oxidačné reakcie, sprostredkované cytochrómom P450, tie sú skôr málo významnou metabolickou cestou u týchto látok na rozdiel od po nich nasledujúcich 2) konjugačných reakcií, presnejšie glukuronidácia, sulfatácia a metylácia pomocou konjugačných enzýmov UDP-glukuronosyltransferázy (UGT), sulfotransferázy (SULT), katechol-O-methyltransferázy (COMPT) za vzniku príslušných konjugátov s nižšou biologickou aktivitou. Aj tieto vzniknuté konjugáty podliehajú effluxu do lumenu čreva pomocou membránových transportérov z rodiny ABC. Zvyšok metabolitov je následne transportovaných do cieľových tkanív avšak časť z nich sa stáva súčasťou enterohepatálneho obehu a následne je vylučovaná močom a stolicou. Flavonoidné metabolity, ktoré neboli vstrebané v tenkom čreve a flavonoidné glykozidy, ktoré nepodliehali hydrolytickým reakciám sú transportované ďalej do hrubého čreva. Metabolizmus flavonoidov v žalúdku, tenkom čreve a pečeni, ich fyzikálne chemické vlastnosti i efflux z buniek črevnej sliznice vedie k nízkej črevnej absorpcii aglykónu, ktorá činí väčšinou maximálne 10-20% z celkového množstva flavonoidov. (Kaushal et al. 2022)

### **5.1.8. Kolonický metabolizmus flavonoidov**

Flavonoidy ďalej podliehajú metabolizmu v hrubom čreve, kde sú štrukturálne modifikované a mikrobiálne degradované pôsobením črevnej bakteriálnej mikroflóry. (Kaushal et al. 2022)

Mikrobióm hrubého čreva sa aktívne podieľa na metabolizme flavonoidov. V kolone sa totiž nachádza významne väčšie množstvo baktérií ako tomu bolo v tenkom čreve. Jedná sa hlavne o obligátne anaeróbne formy baktérií. (Trojan 2003) Patria sem *Bifidobacteria*,

*Actinobacteria, Bacteroidetes, Clostridium, Enterococcus, Firmicutes, Fusobacteria, Lactobacillus, Eubacterium ramulus, Spirochaeta* a ďalšie. Aeróbne baktérie, kam spadá *Escherischia coli* sa nachádzajú v kolone v zanedbateľnom množstve, ktoré sa pohybuje okolo 1%. (Kaushal et al. 2022)

Väčšina flavonoidov a to ako vo forme glykozidov, tak aglykónov, ktoré neboli absorbované v tenkom čreve, alebo črevným/pečeňovým metabolizmom vzniknuté konjugáty, sú v kolone mikrobiálne štiepené. Heterocyklus flavonoidov sa štiepi v rôznych miestach za vzniku aromatických kyselín a ďalších malých fenolických látok. Medzi ne patria fenyloctové, fenypropiónové a benzoové kyseliny a malé benzénové deriváty. Rada týchto látok má hydroxyskupinu pôvodom z kruhu B. Tieto metabolity sú ďalej konjugované v pečeni alebo v obličkách okrem iného aj na kyselinu hippurovú a ďalej vylučované močom. Na základe ich novo vzniknutých fyzikálnych a chemických vlastností sa metabolity lepšie vstrebávajú. (Kaushal et al. 2022;Gao et al. 2006)

Okrem prítomnosti heterocyklického kruhu je mikrobiálna degradácia závislá aj na zoskupení hydroxylových skupín v molekule flavonoidu. Práve prítomnosť týchto skupín v polohách 4',5 a 7 zvyšuje odolnosť molekuly voči štiepeniu kruhu. (Choudhury et al. 1999)

Metabolity flavonoidu rutinu sa po jeho per orálnom príjme nachádzajú v plazme až po 4 až 8 hodinách. To dokazuje, že k jeho majoritnému vstrebávaniu dochádza až v kolone. (Jaganath et al. 2006)

O osude kruhu A molekuly flavonoidu v organizme sa vie veľmi málo. Predpokladá sa, že dochádza k vzniku floriglucínolu (1,3,5-trihydroxybenzén) a jeho derivátov s možnou následnou degradáciou za vzniku oxidu uhličitého. (Greafe et al. 1999)

V priebehu 50. rokov 20. storočia boli identifikované prvé flavonoidné metabolity, išlo o 3,4-dihydroxyfenyloctovú kyselinu, 3-hydroxyfenyloctovú kyselinu a homovanilovú kyselinu. Látky sa našli v moči zvierat po per orálnom príjme kvercetínu. (Dias et al. 2022)

Kvercetín ako jeden z najlepšie preskúmaných a najznámejších flavonoidov má celú radu metabolitov, kam okrem vyššie spomenutých kyselín dnes zaraďujeme aj kyselinu protokatechuovú alebo kyselinu 3-(3-hydroxyfenyl)propiónovú. (Semaming et al. 2015)

Je nutné poznamenať, že napríklad kyselinu protokatechuovú (kyselina 3,4-dihydroxybenzoová), ktorú považujeme za jeden z najlepšie preskúmaných metabolitov, je možné získať aj ako metabolit anthokyánov a kyselina homovanilová (kyselina 4-hydroxy-3-



metoxyfenyloctová) je metabolit minimálne 4 rôznych flavonoidov. Kyselina homovanilová je taktiež obsiahnutá v celej rade rastlín, ktoré sú využívané v potravinárstve, ako je *Olea europaea*, *Vitis vinifera*, *Hibiscis sabdariffa*, *Eucommia ulmoides*, *Citrus microcarpha Bunge*. (Semaming et al. 2015)

Kyselina 3-hydroxyfenyloctová je pokladaná za jednu z najmenej preskúmaných metabolitov, hoci ide o metabolický produkt celej rady flavonoidov, príkladom sú kvercetín, rutín, kempferol, monoméne flavanoly katechín a epikatechín ale aj oligomére prokyanidíny. (Dias et al. 2022)

Niektoré z týchto metabolitov, presnejšie povedané 3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina a homovanilová kyselina sú taktiež známe aj ako endogénne, resp. telu vlastné látky. Podieľajú sa na metabolizme katecholamínov, kam spadá napríklad degradácia dopamínu. (Graefe et al. 1999)

Kyselina hippurová alebo tiež označovaná aj ako N-benzoylglycín vzniká ako produkt hepatálnej konjugácie fenolových kyselín s glycínom. Bolo dokázané, že znížená hladina tejto kyseliny má súvislosť s rozvojom metabolických ochorení, obezitou a hypertenziou. (Henning et al. 2013)

Významnú úlohu hrá v tomto prípade aj črevná mikroflóra, nakoľko každý organizmus má iné zastúpenie a zloženie črevných baktérií a tým pádom dochádza k tvorbe trochu iného kvantitatívne a kvalitatívne zastúpeného spektra metabolitov. (Semaming et al. 2015)

Spomedzi flavonoidných látok, oligoméry a polyméry flavan-3-olov, ktoré súhrne označujeme ako proanthokyanidíny sa nedegraduujú na monoméry, ako by sa dalo čakať, ale sú taktiež metabolizované črevnou mikroflórou na fenolové kyseliny, presnejšie na deriváty kyseliny fenypropiónovej, fenyloctovej a benzoovej. (Monagas et al. 2009)

Taktiež metabolizmus izoflavonoidov má svoje špecifiká. Medzi metabolické produkty genisteínu a daidzenu sa radí nielen kyselina 4-hydroxyfenyloctová ale aj equol, ktorý svoje maximálne hladiny v ľudskom organizme dosahuje po 16 hodinách. Equol sa ďalej štiepi na menšie fenolové kyseliny. (Gao et al. 2006)

### 5.1.9. Výskyt v rastlinách

Flavonoidy sú kľúčoví participanti v rôznych dôležitých biologických procesoch v rastlinách. Zabezpečujú sfarbenie kvetov a plodov, čo slúži k prilákaniu opel'ovačov. Ďalej slúžia protektívne voči rôznym druhom stresorov ako sú bylinožravci, huby, baktérie, ale taktiež zabezpečujú absorpciu ultrafialového žiarenia. Podieľajú sa na raste, vývoji rastlín. Príkladmi rastlín, ktoré vďaka obsahu flavonoidov majú výrazné benefity pre zdravie človeka sú *Ginko biloba* alebo vyššie spomenutú *Glycine max*. Ginko má vďaka obsahu flavonoidných glykozidov výrazné antibakteriálne, protivírusové, protizápalové, protirakovinové účinky. Výnimočnou vlastnosťou jej aj jeho neuroprotektívita, ktorá sa v praxi široko uplatňuje. Tá môže byť ale sprostredkovaná aj inými látkami – terpenickými lakónmi ginkgolidymi. Ďalšou rastlinou s medicínalnými benefitmi je sója fazuľová, ktorá napomáha udržiavať optimálny krvný tlak, rozhodujúci je aj vplyv sóji na homeostázu pohlavných hormónov a preto sa sója používa pri zmiernovaní príznakov menopauzy. (Shen et al. 2022; Niu et al. 2022)

Okrem rastlín, ktoré sú svojimi výhodami pre zdravie človeka známe, tak sú tieto látky obsiahnuté aj v ovocí alebo zelenine, kde taktiež zohrávajú dôležitú úlohu. V rajčiakoch jedlých je oneskorené dozrievanie plodov spojené práve s antioxidačnými vlastnosťami obsiahnutých flavonoidov. Je totiž známe, že paradajky obohatené o anthokyány majú výrazne dlhšiu trvanlivosť v dôsledku oneskoreného zretia a majú zvýšenú obranyschopnosť voči patogénom. (Petric et al. 2018)

## 5.2. Klinické vlastnosti flavonoidov

### 5.2.1. Úvodný prehľad

Flavonoidy vykazujú široké spektrum zdraviu prospešných vlastností, ktoré je možné teoreticky využiť v terapiách chronických, ale aj akútnych chorôb. Ich priaznivé účinky môžu byť využiteľné v terapiách kardiovaskulárnych ochorení, aterosklerózy, neurodegeneratívnych ochorení alebo v terapiách rôznych typov karcinómov. (Panche et al. 2016)

Už v dnešnej dobe sa na liečbu niektorých chorôb využívajú určité flavonoidy alebo ich zmesi. Diosmín, rutín, hesperidín sú dnes súčasťou mnohých bežne užívaných registrovaných

liečivých prípravkov na liečbu príznakov žilnej insuficiencie dolných končatín, alebo pri zmierňovaní príznakov a liečbu hemoroidálnych ochorení. (Shen et al. 2022)

Početné štúdie dokázali, že flavonoidy sú aktívni supresori zápalových cytokínov, modulátorov dráh súvisiacich so zápalom. Dilatujú cievy, zlepšujú endoteliálnu dysfunkciu a znižujú tak krvný tlak, chránia proti agregácií doštičiek, inhibujú makrofágovú infiltráciu v tukovom tkanive, čo dokazuje, že majú preukázaný priaznivý efekt v ochrane voči ochoreniam kardiovaskulárneho systému. (Shen et al. 2022)

Je dokázané, že flavonoidy majú ochranné vlastnosti aj v progresii inzulínovej rezistencie prostredníctvom regulácie pankreatických  $\beta$  buniek, hepytocytoov a adipocytov. (Shen et al. 2022). Kvercetín významne znižuje glykémiu, ale taktiež výrazne znižuje telesnú hmotnosť a hladiny triacylglycerolov (TAG). (Zhang et al. 2018)

U apigenínu zase existujú štúdie, ktoré popisujú jeho schopnosť inhibovať progresiu nealkoholovej steatózy pečene a to znížením lipidovej akumulácie a znížením oxidačného stresu. (Pang et al. 2019)

Je nutné si ale uvedomiť, že pri bežnom per orálnom podaní sa rada týchto účinkov neprejaví, vďaka veľmi nízkej biodostupnosti parentných flavonoidov. Na druhej strane môžu byť niektoré popisované účinky navodené ich metabolitmi, vyššie popísanými malými fenolickými látkami.

### **5.2.2. Antioxidačné vlastnosti flavonoidov**

Dlhodobu sa traduje, že prírodné antioxidanty majú cenné účinky na ľudské zdravie a to v prevencii celej rady ochorení. (Safaeian et al. 2018)

Predpokladalo sa, že kľúčovú úlohu majú antioxidačné vlastnosti aj pri neurodegeneratívnych ochorenia, typicky Alzheimerova alebo Parkinsonova choroba. Bol preskúmaný vzťah medzi progresiou ochorení a homeostázou železa, medi, zinku, ktoré pravdepodobne hrajú dôležitú úlohu v patofyziológii minimálne Alzheimerovej choroby, hoci presný patofyziologický mechanizmus ochorení nie je známy. Kovy ako sú zinok, železo alebo meď sú esenciálne v centrálnom nervovom systéme a zúčastňujú sa enzymatických pochodov, mitochondriálnych funkcií, neurotransmisie a sú dôležité taktiež vo veciach pamäti a učenia.

V prípade ak nastane dysregulácia hladín kovov, dochádza k bunkovej smrti v určitých mozgových oblastiach a tým aj k progresii neurodegenerácie. Taktiež bola zistená prítomnosť medi a zinku v amyloidných plakoch, ktoré sú typické u pacientov s Alzheimerovou demenciou. (Friggeri et al. 2014)

Oxidačný stres a znížená antioxidačná obrana organizmu je dobre popísaným mechanizmom aj v rozvoji kardiovaskulárnych ochorení, môže spôsobovať vznik alebo zhoršenie stavu arteriálnej hypertenzie, aterosklerózy i ischemickej choroby srdca. Oxidačný stres taktiež prispieva k celkovej progresii ochorení u diabetických pacientov. (Safaeian et al. 2018)

Príčinou oxidačného poškodenia sú voľné radikály, ktoré primárne delíme na reaktívne formy kyslíka (ROS) a reaktívne formy dusíka (RNS). ROS sú reaktívne formy, väčšinou radikály, s najväčším výskytom v živých organizmoch. Zaraďujeme sem superoxid, kyslíkový radikál, hydroxylový radikál, alkoxy radikál, peroxylový radikál, peroxid vodíku a ďalšie. Za bežných fyziologických podmienok sú tieto radikály v určitej rovnováhe, ktorá je kľúčová pre udržanie zdravia. Vplyvom starnutia organizmu, niektorých nezdravých návykov, prípadne toxických látok dochádza k prekročeniu hranice fyziologicky akceptovateľného množstva voľných radikálov a vzniká riziko poškodenia organizmu. Voľné radikály totiž poškodzujú celé spektrum biomolekúl vrátane lipidov, proteínov a DNA. (Sun et al. 2022)

Flavonoidná antioxidačná aktivita je považovaná za jednu z najlepšie preskúmaných klinických vlastností flavonoidov. Ľudský organizmus je prirodzene schopný udržiavať rovnováhu medzi antioxidantmi a oxidantmi a to prostredníctvom antioxidačných obranných systémov. V priebehu patologických stavov však dochádza k nerovnováhe týchto systémov a pôsobením voľných radikálov v konečnom dôsledku vedie k poškodeniu buniek. Vďaka antioxidačným schopnostiam sa predpokladalo, že flavonoidy môžu brániť alebo zmierňovať príznaky širokého spektra ochorení, ktoré úzko súvisia s oxidačným stresom. (Shen et al. 2019) Vzhľadom k ich nízkej biodostupnosti toto ale nie je pravdepodobne biologicky relevantné pri perorálnom podaní.

Na to aby látka fungovala ako priamy vychytávač ROS, musia byť splnené určité podmienky v chemickej štruktúre molekuly látky. V prvom rade musí táto molekula obsahovať dve hydroxylové skupiny v *ortho* polohe na kruhu A alebo B. Na kruhu C musí byť prítomná 2,3-dvojitá väzba, ktorá bude v konjugácii so 4-oxo funkčnou skupinou. Toto zoskupenie funkčných skupín bude zabezpečovať delokalizáciu elektrónov. Ďalšou nemej dôležitou

podmienkou je prítomnosť hydroxylovej skupiny v polohách 3 a 5, vďaka čomu bude vznikáť vodíková väzba s oxoskupinou. Prítomnosť a správne usporiadanie hydroxylových skupín teda výrazne ovplyvňujú antioxidačnú aktivitu látky. (Shen et al. 2022)

Tieto štrukturálne podmienky sú dôležité kvôli flavonoidnej schopnosti darovať elektróny ROS/RNS a tým znižovať ich hladiny a to za vzniku stabilných flavonoidných radikálov a stabilizácie ROS/RNS. (Perez et al. 2014)

Je známe, že akákoľvek alkylácia alebo acetylácia hydroxylových skupín na kruhu A a B výrazne znižuje biologickú antioxidačnú aktivitu flavonoidov. Flavonoidy takto nie sú schopné interakcie s väzobnými enzýmami a tým pádom nie sú schopné zhasťovania ROS. (Sarian et al. 2017)

Zvýšenú antioxidačnú aktivitu vykazujú polymérne flavonoidy tj. proanthokyanidíny, nakoľko obsahujú zvýšený počet hydroxylových skupín a to v polohách, ktoré boli vyššie spomenuté. Schopnosť vychytávať ROS môže byť podporená prítomnosťou dvojitých väzieb vo fenolovom kruhu, hydroxylovými bočnými reťazcami alebo glykozilovanými anthokyanidínmi. (Shen et al. 2022)

Antioxidačný účinok flavonoidov nemusí byť dosiahnutý však len jedným mechanizmom, ale môže ísť o kombináciu viacerých účinkov. Okrem eliminácie ROS/RNS môže dochádzať ku vzniku antioxidačnej ochrany pomocou interakcie s enzýmami, ktoré riadia tvorbu radikálov, ako sú glutathion-S-transferáza, NADH-oxidáza, mikrozomálna monooxygenáza alebo mitochondriálna sukcinoxidáza. Okrem toho sú flavonoidy schopné zvyšovať ochranu antioxidačných systémov a vďaka svojmu nízkemu redoxnému potenciálu majú flavonoidné látky schopnosť chelátovať kovové ióny a tým znižovať tvorbu voľných radikálov. (Perez et al. 2014)

### **5.2.3. Prooxidačná aktivita**

Za určitých podmienok spojených s vyššou dávkou flavonoidov alebo s patologickým stavom môžu flavonoidy vykazovať preferenčne skôr prooxidačné vlastnosti. Nesú so sebou riziko inhibície mitochondriálneho dýchania, priameho poškodenia DNA, peroxidácie lipidov a inhibície enzýmov zapojených do metabolizmu hormónov, čo môže viesť k ireverzibilnému

poškodeniu organizmu. Na druhej strane prooxidačné účinky flavonoidov vedú k apoptóze rakovinových buniek. (Moř et al. 2014)

Ich pôsobenie v protinádorovej terapii je však sporné, nakoľko u niektorých flavonoidov boli hlásené mutagénne a kokarcinogénne vlastnosti. Tieto vysoko škodlivé vplyvy na ľudský organizmus sú pripisované práve prooxidačným vlastnostiam a schopnosti generovať voľné radikály. (Kopustinskiene et al. 2020)

Interakciou flavonoidov s ROS vznikajú fenoxylové radikály, ktorých životnosť je nízka a pohybuje sa okolo 200  $\mu$ s. Rizikové sú tieto radikály kvôli ich vysokej reaktivite. Ďalej podliehajú oxidácii za vzniku stabilnejších flavonoidných chinónov. Tie sú síce stále reaktívne, ale je možné ich stabilizovať pomocou konjugácie s nukleofilmi, napr. glutatiónom (GSH) cysteínom. Fenoxylové radikály môžu taktiež vznikáť vplyvom enzýmov tzv. peroxidáz. Intracelulárne sú fenoxylové radikály tvorené myeloperoxidázou lokalizovanou v neutrofiloch. Enzým taktiež indukuje peroxidáciu lipidov a kooxidáciu GSH za vzniku thiolových radikálov. Ďalšou alternatívou vzniku flavonoidných radikálov je autooxidácia. Príkladom je kvercetín, ktorého autooxidácia nastáva spontánne pri fyziologickom pH. Autooxidácia myricetínu je urýchlená pridaním železa. Flavonoidy s príslušným trihydroxylovým zoskupením ako aj hydroxylové skupiny v polohe *para* vykazujú značnú autooxidáciu. Na druhej strane flavonoidy ako kempferol, rutín, monohydroxylové flavonoidy alebo glykozilovaný kvercetín nevykazujú žiadne známky autooxidácie. Flavonoidy s vyšším počtom hydroxylových skupín v kruhu B významne zvyšujú produkciu voľných radikálov vo Fentonovej reakcii. (Procházková et al. 2011)

Flavonoidy, ktoré vo svojej štruktúre majú obsiahnutú katecholovú štruktúru, napr. kvercetín, luteolín alebo eriodiktyol majú schopnosť oxidovať nízkomolekulárne antioxidanty NADH, askobárt alebo GSH. Vo všeobecnosti sa dá v tomto prípade uplatniť pravidlo, že čím majú flavonoidy nižší redoxný potenciál, tým ľahšie sú oxidované  $H_2O_2$  alebo peroxidázou a tým ľahšie oxidujú nízkomolekulárne antioxidanty. (Procházková et al. 2011)

Bolo zistené, že so zvyšujúcou sa koncentráciou flavonoidov kvercínu, myricetínu a kempferolu dochádza k zníženiu jadrového GSH a aktivity glutatión-S-transferázy (GST). Myricetín, ktorý má zo všetkých troch flavonoidov najviac hydroxylových skupín bol najaktívnejší. Narušenie antioxidantnej ochrany, ktorá pozostáva z GST a GSH v bunkovom jadre vedie k poškodeniu genetického materiálu a peroxidácii membránových lipidov. (Sahu et al. 1996)

#### **5.2.4. Protizápalová aktivita**

Zápalový proces hrá významnú fyziologickú úlohu v obrane organizmu a pri hojení rán. Avšak v prípadoch, kedy dochádza k poruchám regulačných mechanizmov zápalu, zápalový stav pretrváva a prechádza do chronicity. Následne môže dôjsť k poškodeniu tkanív a orgánov. Zápal je súčasťou celej rady chronických ochorení ako je diabetes mellitus, kardiovaskulárne alebo aj neurologické ochorenia. Zápalové procesy sú sprostredkované prozápalovými cytokínmi, interleukínmi, ktoré označujeme IL-1, IL-6, IL-8, IL-13, ďalej to je prostredníctvom tumor nekrotizujúceho faktoru  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), amyloidu A $\beta$  ale aj C reaktívnym proteínom (CRP). Súčasťou zápalového procesu je aj oxidačný stres, ktorý poškodzuje tkanivá. Vplyvom oxidačného stresu dochádza k narušeniu integrity buniek, deštrukcii proteínov, lipidov a nukleových kyselín. (Al-Aubaidy et al. 2021)

Bolo zistené, že 12 týždňové podávanie potravy bohatej na citrusové flavonoidy (naringín a hesperidín) významne znížilo hladiny IL-6, ako aj hladiny 8-OHdg, čo je skratka pre oxidovanú formu guanosínu, ktorá sa používa ako biomarker oxidačného stresu u RNA. (Al-Aubaidy et al. 2021)

Naringín taktiež v rôznych štúdiách preukázal svoje antioxidantné, protizápalové, antimikrobiálne a antiaterogénne vlastnosti. V Číne existuje naringín vo forme patentovaného liečivého prípravku, ktorý má vlastný článok v liekopise. Ide o perorálnu tekutú liekovú formu, ktorá sa používa pri liečbe chronických zápalových ochorení dýchacích ciest, ako je astma alebo chronická obštrukčná choroba pľúc. Naringín totiž znižuje hladinu prozápalových cytokínov a taktiež podporuje tvorbu tých protizápalových. Klinický benefit naringínu spočíva v rýchlejšom zotavení pacientov, ako aj v znížení počtu komplikácií spojených so zápalovým ochorením. (Yao et al. 2021)

#### **5.2.5. Antihypertenzná aktivita**

Celosvetovo sú ochorenia kardiovaskulárneho systému považované za najrozšírejšiu skupinu chronických ochorení s najvyššou morbiditou a mortalitou. (North a Sinclair 2012)

Dominantným rizikovým faktorom je zvýšený krvný tlak, resp. arteriálna hypertenzia, ktorá spôsobuje až 9,4 miliónu úmrtí ročne. (Ettehad et al. 2016)

V kategórii neovplyvniteľných rizikových faktorov vedú vek a pohlavie, kedy vo veku do 55 rokov dominujú ochorenia kardiovaskulárneho systému u mužov, vo veku nad 55 rokov už tento rozdiel medzi pohlaviami nie je taký výrazný. Ďalej je riziková zlá životospráva, nedostatok pohybu, fajčenie, obezita, ale rizikové sú aj pridružené ochorenia ako je diabetes mellitus alebo dyslipidémia. (Saeed et al. 2017)

Oxid dusnatý je dôležitou látkou, ktorá sa zúčastňuje vo fyziologických procesoch v červených krvinkách alebo v endotele ciev. Má protektívnu funkciu v kardiovaskulárnom systéme. Dôležitý je oxid dusnatý v procese relaxácie buniek hladkého svalstva, prevencii adhézie a migrácie leukocytov do steny artérií, ako aj v prevencii proliferácie, adhézie a agregácie krvných doštičiek. Vzniká z L-arginínu oxidáciou, ktorá je katalyzovaná enzýmom tzv. NO syntázou (NOS). Nedostatok NO môže viesť ku vzniku a následnej progresii oxidačného stresu v kardiovaskulárnom systéme. Toxický je v tomto prípade peroxynitrit, ktorý je silným oxidantom a spôsobuje patologické zmeny v organizme. Vzniká reakciou NO so superoxidom ( $\cdot\text{O}_2^-$ ). Dlhodobá expozícia ciev oxidačnému stresu môže viesť ku vzniku endoteliálnej dysfunkcie, ktorá sa vyznačuje zníženou vazodilatáciou, prozápalovým a protrombotickým stavom. Typická je pri endoteliálnej dysfunkcii nedostatočná biologická dostupnosť NO. Tento jav môže byť spôsobený jeho zníženou syntézou alebo zvýšeným odbúraním prostredníctvom ROS. (Ancion et al. 2019)

Mechanizmus ktorým flavonoidy pôsobia na tento patofyziologický proces je inhibícia indukovateľnej formy syntézy oxidu dusnatého (NOS), zvýšená aktivita endoteliálnej NOS a tým aj zvýšenie produkcie NO. Pre zachovanie tejto vlastnosti musí štruktúra flavonoidu obsahovať 2,3-dvojitú väzbu, 4-ketoskupinu, 3,5,4'-trihydroxylovú skupinu a metyláciu v polohách 3 a 5 alebo 4-hydroxyskupinu, čo môže zvýšiť antioxidačnú aktivitu. (Shen et al. 2022)

Už niekoľko štúdií potvrdilo antihypertenzné účinky flavonoidu kvercetínu a jeho blízkeho derivátu kempferolu, kedy podávanie 150 mg kvercetínu po dobu 6 týždňov znížilo systolický tlak u hypertenzných jedincov o 2,6 mm Hg. (Larson et al. 2012)

Kvercetín ovplyvňuje arteriálnu hypertenziu aj svojou schopnosťou zlepšovať vaskulárne vlastnosti endotelu. Zo všetkých flavonoidov má práve kvercetín najvýraznejší efekt na zvyšovanie hladín NO. (Larson et al. 2012; Shen et al. 2022)



Zaujímavý je fakt, že na dosiahnutie dostatočného účinku kvercetínu je potrebný určitý stupeň arteriálnej hypertenzie, nakoľko u normotenzných pacientov nedochádzalo k žiadnemu ovplyvneniu tlaku a v niektorých prípadoch ku zmenám nedochádzalo ani u pacientov, u ktorých bola zaznamenaná prehypertenzná fáza ochorenia. Kľúčovým faktorom je v tomto prípade aj vek pacienta, kedy k zlepšeniu endoteliálnej funkcie dochádzalo skôr u pacientov mladšieho veku, poprípade u pacientov v strednom veku. V týchto skupinách pacientov je arteriálna hypertenzia spôsobená primárne zvýšením periférneho vaskulárneho odporu, zúžením odporových artérií a arteriol, S pribúdajúcim vekom dochádza k aterosklerotickým zmenám na artériách, kedy tieto zmeny vedú k zvýšenej rigidite ciev a vaskulárnej dysfunkcii. (Egert et al. 2009)

Ďalšia štúdia na prehypertenzných japonských mužoch a ženách ukázala, že proanthocyanidínový extrakt z hroznových semien má tendenciu znižovať arteriálny krvný tlak a zlepšovať elasticitu ciev, ovplyvňuje hrúbku steny a ukladanie kolagénu do stien ciev. (Odai et al. 2019)

V posledných rokoch však dochádza k prehodnoteniu flavonoidných antihypertenzných vlastností a novšie štúdie sa prikláňajú skôr k možnosti, že zníženie arteriálneho krvného tlaku je spôsobené malými fenolickými látkami, resp. flavonoidnými metabolitmi. Príkladom toho je aj fakt, že v prípade flavonoidu kvercetínu, jeho aglykón, poprípade konjugačné metabolity nevykazujú *in vivo* žiadne antihypertenzné vlastnosti a ich koncentrácia v plazme je takmer nulová. Môže to znamenať, že v prípade per orálneho príjmu kvercetínu by jeho doposiaľ pripisované vazorelaxačné vlastnosti boli v skutočnosti sprostredkované zmesou metabolitov vznikajúcich v GIT. (Pourová et al. 2018)

Dôkazom toho je aj objav antihypertenzných vlastností u metabolitov kvercetínu, kedy rôznym mechanizmom dochádza ku zníženiu arteriálneho krvného tlaku po podaní kyseliny 3-(3-hydroxyfenyl)propiónovej, kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctovej alebo 4-methylcatecholu. Viac k téme antihypertenzné účinky malých fenolových látok bude pojednávané v kapitole 3.3.4. (Najmanová et al. 2020)

### 5.2.6. Protidoštičková aktivita

Zvýšená agregácia krvných doštičiek je úzko spätá s patofyziológiou širokého spektra chronických ochorení. Ovplyvnenie agregácie trombocytov môže mať protektívne vlastnosti v úlohe kardiovaskulárneho zdravia. (Ciumărnean et al. 2020)

Protidoštičkový účinok flavonoidov je sprostredkovaný hlavne antagonizmom tromboxánových A<sub>2</sub> receptorov, okrem toho v prípade izoflavonoidov bola zistená schopnosť inhibovať COX-1 (cyklooxygenáza-1), kedy tento ich účinok bol čiastočne porovnateľný s efektom kyseliny acetylsalicylovej, ktorá sa bežne používa v sekundárnej prevencii kardiovaskulárnych príhod. V prípade porovnania schopnosti inhibovať COX-1, najvýraznejšie zo všetkých flavonoidov sa táto aktivita prejavila u izoflavonoidu genisteínu. Na preukázanie tohto efektu izoflavonoidov bola esenciálna prítomnosť izoflavónového kruhu so 7-hydroxylovou skupinou. Je teda zjavné, že poloha kruhu B je kľúčová pre inhibíciu COX-1. Pre antagonizmus A<sub>2</sub> tromboxánových receptorov nie sú tieto štrukturálne podmienky závažné a aktivitu neovplyvňujú. (Karlíčková et al. 2016)

Okrem významného ovplyvnenia metabolizmu kyseliny arachidónovej flavonoidy ovplyvňujú agregáciu krvných doštičiek aj zmenami v produkcii kolagénu, ktorý je známy svojím významným vplyvom na prvú fázu agregácie krvných doštičiek. (Ciumărnean et al. 2020)

Pribúdajúce informácie o flavonoidnom metabolizme však naznačujú, že materské flavonoidy nemusia byť hlavným zdrojom protidoštičkovej aktivity, nakoľko v krvi sa vyskytujú v prakticky nemerateľnom množstve. Je teda možné tento protidoštičkový jav pripísať ich metabolitom, malým fenolovým kyselinám, ktoré sa na rozdiel od materinských flavonoidov vstrebávajú do systému v signifikantnom množstve. Medzi flavonoidné metabolity s preukázanou schopnosťou blokovať agregáciu trombocytov patria kyselina hyppurová, rezorcinol, pyrogalol a-methylcatechol. (Applová et al. 2019)

### 5.2.7. Hypolipidemická aktivita

Schopnosťou znižovať hladiny LDL (low-density lipoprotein) cholesterolu flavonoidy prispievajú k celkovej protekcii kardiovaskulárneho systému. Keďže ateroskleróza je patologický stav, kedy dochádza k akumulácii lipidov v stenách ciev, je príčinou vzniku a progresie mnohých chronických ochorení, typicky infarktu myokardu. Z patofyziologického hľadiska je ateroskleróza charakterizovaná akumuláciou penových buniek v subendoteliálnom priestore. Podkladom je vysoká hladina častíc cholesterolu (hlavne LDL) inkorporovanými makrofágmi. Tieto biele krvinky imunitného systému vedú k nadmernému uvoľňovaniu oxidovaných molekúl LDL cholesterolu. Okrem toho dochádza makrofágmi indukovanej zápalovej reakcii. (Ciumărnean et al. 2020)

Je známe, že červené víno významne ovplyvňuje krvné hladiny lipidov vrátane postprandiálnej lipidémie. Pomocou inhibície pankreatickej lipázy, dochádzalo k zníženému vstrebávaniu triglyceridov a tým k ovplyvneniu postprandiálnej lipidémie. Pankreatická lipáza je totiž kľúčový enzým, ktorý hydrolyticky štiepi triglyceridy na menšie častice schopné vstrebávania do krvného obehu. Týmto mechanizmom flavonoidy nie len ovplyvňujú hladinu lipidov, ale sú úzko spojené so stratou hmotnosti, znižovaním obezity v populácii a v prevencii kardiovaskulárneho rizika. Bolo pozorované, že príjem červeného vína viedol taktiež k významnému zníženiu hydroperoxidov lipidov, čo je vysoko proaterogénna frakcia. Tento efekt červeného vína je pripisovaný obsiahnutým flavonoidom z niekoľkých tried, v zásade sa jedná o flavanoly (epikatechín), flavonoly (kvercetín) a antokyány (malvidín-3-glukozid). (Fernandez et al. 2017)

Ako už bolo vyššie spomenuté skupina athokyánov ovplyvňuje hladiny lipidov. O tento fakt sa opiera aj niekoľko štúdií, kedy sa zistilo, že dlhodobé podávanie týchto látok má podstatný vplyv nie len na znižovanie hladín proaterogénneho LDL cholesterolu, ale taktiež dochádza k ovplyvneniu a zvýšeniu hladín HDL (high-density lipoprotein) cholesterolu, ktorý má kľúčové antiaterogénne vlastnosti, čiže ide o celkové zlepšenie lipidového profilu. (Curtis et al. 2013)

### 5.2.8. Antihyperglykemická aktivita

Diabetes mellitus je chronické metabolické ochorenie, ktoré je charakterizované zvýšenou hladinou cukru v krvi, tj. hyperglykémiou. Patofyziologickým základom ochorenia je porucha sekrécie inzulínu alebo porucha účinku inzulínu v cieľovom tkanive, poprípade kombinácia oboch mechanizmov. Chronická expozícia tkanív hyperglykemickému stavu má za následok ireverzibilné poškodenie orgánov, ich dysfunkciu a následné zlyhanie. Poškodené sú hlavne oči, obličky, nervy, srdce alebo cievy. (American diabetes association 2013)

Skupina látok, ktorú súhrne označujeme pojmom anthokyány sa vyznačujú širokým spektrom pozitívnych účinkov u pacientov s diabetom. Látky regulujú expresiu génu pre glukózový transportér typu 4 (GLUT4), zvyšujú aktiváciu tzv. peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) a to ako v tukovom tkanive, tak aj v kostrovom svalstve dochádza k zvýšeniu sekrécie adiponektínu a leptínu. Jedná sa o to inhibítory intestinálneho enzýmu  $\alpha$  glukozidázy, ako aj pankreatickej  $\alpha$ -amylázy. Flavonoidná skupina anthokyanov má pozitívny vplyv aj na sekréciu inzulínu v  $\beta$  bunkách pankreasu. Na základe vyššie spomenutých účinkov sa vedci zhodujú na pozitívnom metabolickom vplyve zvýšenej konzumácie ovocia a zeleniny s obsahom anthokyanov v prevencii a liečbe diabetu. (Róžańska a Regulska-Ilow 2018)

## 5.3. Metabolity flavonoidov

### 5.3.1. Účinky fenolových kyselín *in vitro* a *in vivo*

Nakoľko metabolity flavonoidov majú lepšie farmakokinetické vlastnosti, dochádza k ich lepšiemu vstrebávaniu, ako u materských látok. Tiež bolo zistené, že tieto produkty degradácie flavonoidov majú potentnejšiu fyziologickú aktivitu ako materská flavonoidná látka. (Murota et al. 2018) Je teda možné, že široká škála účinkov, ktoré sú pripisované flavonoidom, sú v skutočnosti účinky ich metabolitov. (Williamson a Clifford 2010)

Na základe vykonaných štúdií je taktiež možné povedať, že mnohé fenolové metabolity flavonoidov rovnako alebo účinnejšie ovplyvňujú fyziologické funkcie organizmu. (Yang et al. 2012)

### 5.3.2. Antioxidačná aktivita fenolových kyselín

Podobne ako flavonoidy aj ich metabolity majú multifunkčnú antioxidačnú aktivitu, nakoľko pôsobia ako redukčné činidlá, majú schopnosť chelátovať anióny niektorých kovov a tým zabrániť kovom katalyzovať radikálové reakcie, spomaľujú alebo znižujú rozsah peroxidácie lipidov, taktiež sú schopné zhasť singletový kyslík. Je možné predpokladať, že vzhľadom na širokú škálu mechanizmov, niektoré metabolity sú schopné ovplyvňovať oxidačný stres viac ako jedným spôsobom. (Masella et al. 1999)

Kľúčovú úlohu v antioxidačnom efekte fenolových metabolitov flavonoidov hrá ich štruktúra, kedy je táto vlastnosť sprostredkovaná pomocou aromatického kruhu, na ktorom je pripojená hydroxylová skupina. Hydroxyskupina prepožičiava molekule schopnosť inhibovať aktivitu enzýmov, chelatacie kovov, zapájať sa do procesu tvorby voľných radikálov a sú schopné prerúšať kaskádu reakcií, ktoré by viedli ku peroxidácii lipidov. (Oney-Montalvo et al. 2020)

### 5.3.3. Príklady zástupcov fenolových kyselín s antioxidačnými vlastnosťami

#### 3,4-dihydroxybenzoová kyselina

Kyselina protokatechuová, systematickým názvom kyselina 3,4-dihydroxybenzoová je fenolová kyselina s dvomi hydroxylovými skupinami v *ortho* polohe. Táto látka má široký záber klinicky využiteľných vlastností. Je známa svojimi antimikrobiálnymi, protizápalovými, analgetickými, antiapoptotickými, antifibrotickými, hepatoprotektívnymi, antidiabetickými, antiaterogénnymi, ako aj neuroprotektívnymi schopnosťami. Vo významnej miere boli preskúmané jej antioxidačné vlastnosti, presnejšie vychytávanie rôznych foriem ROS a to hlavne hydroxylového radikálu a superoxidového aniónu. Okrem toho je schopná zvýšiť aktivitu kataláz a glutathiónperoxidázy. (Safaeian et al. 2018)

Medzi jej antioxidačné mechanizmy sa radí aj chelatacia kovových iónov, kedy vďaka prítomnosti dvoch hydroxylových skupín vo svojej štruktúre sú schopné interakcie napríklad so železnatými iónmi. (Guglielmi et al. 2003) Vo všeobecnosti sa dá zhodnotiť, že antioxidačný účinok fenolových kyselín obsahujúcich dve hydroxylové skupiny je výraznejší ako to je

monohydroxylových. Tento efekt je spôsobený vďaka stabilizácii dihydroxylových kyselín na chinóny. (Monagas et al. 2009)

Antiaterogénny efekt kyseliny protokatechuovej je možné pripísať priamemu antioxidantnému efektu, presnejšie znižovaniu rozsahu peroxidácie lipidov. Táto fenolová kyselina taktiež zvyšuje odolnosť LDL častíc voči oxidácii. (Masella et al. 1999)

Kyselina protokatechuová dokázala svojimi antioxidantnými, protektívnymi vlastnosťami inhibovať fragmentáciu DNA spôsobenú oxidačným stresom indukovaným  $H_2O_2$  v ľudských neurónových bunkách. (Semaming et al. 2015)

Podávanie tohto flavonoidného metabolitu znižovalo v štúdiu u starnúcich potkanov oxidačný stres podporou tvorby endogénnych antioxidantných enzýmov. Dochádzalo taktiež k zníženiu oxidačného poškodenia indukovaného  $H_2O_2$  u starnúcich myší. Tieto fakty naznačujú, že kyselina protokatechuová môže zabrániť oxidačnému poškodeniu u starnúcich zvierat. (Semaming et al. 2015)

### **3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina**

Štúdie dokázali, že 3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina, inak označovaná aj ako homoprotokatechuová kyselina, ktorá je metabolitom epigallokatechín-3-gallát, má taktiež antioxidantné účinky. Fenyloctové kyseliny sú hlavnými metabolitmi flavonoidu rutínu (kvercetín-3-rutinozidu) a aj u týchto látok bola popísaná antioxidantná aktivita, ktorá svojím mechanizmom bola veľmi podobná vitamínu E *in vitro*. Avšak táto popísaná antioxidantná aktivita bola nižšia ako to je u materinského flavonoidu. (Olthof et al. 2003)

V rôznych štúdiách, ktoré porovnávali antioxidantnú aktivitu metabolitov, sa ukázalo že práve kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová má najpotentnejšie antioxidantné účinky a znižuje plazmatickú hladinu peroxidovaných lipidov. Predpokladá sa, že tento metabolit svojimi vlastnosťami môže chrániť  $\beta$  bunky pankreasu, ktoré sú vysoko citlivé na oxidačné vplyvy, nakoľko majú relatívne nízky obsah antioxidantných enzýmov. Porucha  $\beta$  buniek je spôsobená v tomto prípade cholesterolom a vznikom mitochondriálnej dysfunkcie. Tým dochádza ku spusteniu oxidačného stresu v bunkách a v konečnom dôsledku k apoptóze. Na základe týchto dejov vznikajú  $\beta$  bunky s poruchou inzulínovej sekrécie. Molekuly ako je kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová teda hrajú významnú úlohu v protekcii pankreasu a jedná sa o dôkaz úzkeho prepojenia antioxidantných vlastností s patofyziológiou dôležitých ochorení, v tomto

prípade rozvoja inzulinovej rezistencie a vzniku diabetu mellitu 2. typu. (Carrasco- Pozo et al. 2015)

### **Hippurová kyselina**

Kyselina hippurová, inak označovaná aj N-benzoylglycín alebo benzénkarbonylaminoetánová kyselina je jedným z najdôležitejších metabolitov tzv. čajových fenolov, kam radíme katechíny. Nakoľko táto kyselina vo svojej štruktúre neobsahuje žiadne hydroxylové skupiny, tak neoplýva ani antioxidačnými protektívnymi vlastnosťami. (Olthof et al. 2003)

#### **5.3.4. Antihypertenzné účinky fenolových kyselín**

Fenolové kyseliny pôsobia na arteriálny krvný tlak na rôznych úrovniach. Kľúčová je vazodilatácia sprostredkovaná pomocou NO, inhibícia angiotenzín konvertujúceho enzýmu, antioxidačné vlastnosti, pomocou ktorých dochádza k znižovaniu oxidačného stresu a to prostredníctvom vychytávania ROS, inhibície NADPH oxidázy a zvýšenia antioxidačnej obrany. (Safaeian et al. 2018)

Veľmi dôležitý mechanizmus, akým je možné znižovať krvný tlak sa odohráva na periférii, kde pôsobia fenolové kyseliny na uvoľňovanie hladkého svalstva ciev. Kyselina 3-hydroxyfenyloctová, kyselina protokatechuová, 3-(3-hydroxyfenyl)-propiónová a 4-methylcatechol hrajú rolu v relaxácii buniek hladkého svalstva ciev. Prvá zo zmienovaných je považovaná za najpotentnejšiu a ďalej sa transformuje na vazoinaktívne metabolity, presnejšie kyselinu hippurovú a benzoovú. Tento mechanizmus, kedy metabolity ovplyvňujú hypertenziu pomocou vazodilatácie ciev a nedochádza k ovplyvneniu srdcovej frekvencie, je kľúčový aj z hľadiska bezpečnosti, nakoľko pomocou sympatiku môže dochádzať ku kompenzácii pri výraznom poklese krvného tlaku. (Dias et al. 2022)

Mechanizmus akým pôsobí kyselina 3-(3-hydroxyfenyl)-propiónová je jej periférna aktivita v cievnom riečisku, ktorá je spojená s NO a vaskulárnou relaxáciou. Minimálna dávka, ktorá je potrebná na túto aktivitu je 2,5 mg/kg váhy. Hoci ide o potentný účinok nevýhodou tohto metabolitu je jeho krátky biologický poločas a tým aj krátke trvanie účinku. U zdravých

potkanov po intravenózne aplikácii tejto fenolovej kyseliny došlo k zníženiu krvného tlaku o 15-60 %, avšak normalizácia a návrat k pôvodnej hodnote nasledoval do 10-30 minút po aplikácii. Výhodou však je, že kyselina 3-(3-hydroxyfenyl)-propiónová je metabolit viacerých flavonoidov a tak nie je jeho účinok závislý len na príme jedného z nich. Vzniká z flavonoidov ako je kvercetín (kedy je tento metabolit o jeden rád účinnejší ako materský flavonoid) ale aj z oligomérnych proanthokyanidínov, alebo flavonónu diosmínu. (Najmanová et al. 2016)

Vyššie spomenuté metabolity 3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina a 4-methylcatechol majú dokázané krátkodobé relaxačné účinky na steny ciev *ex vivo* aj *in vivo*. Účinky v oboch prípadoch boli periférne a ani tentokrát nebol mechanizmus ovplyvnení srdcovou činnosťou. Avšak spôsob akým tie metabolity sprostredkovávajú vazodilatáciu nie je rovnaký u oboch metabolitov. V prípade 3,4-dihydroxyfenyloctovej kyseliny je reakcie ciev sprostredkovaná vplyvom na endotel a NO, zapojené sú aj prostaglandíny a  $Ca^{2+}$  a  $K^+$  kanály. Efekt 4-methylcatecholu je nezávislý na spomenutých účinkoch. (Pourová et al. 2018)

Predpokladá sa, že okrem indukcie syntézy NO môžu flavonoidy pomocou antioxidantných protektívnych mechanizmov pôsobiť na zníženie rozkladu NO. Nakoľko z jedného flavonoidu nikdy nevznikne len jeden typ metabolitu, profil metabolitov účinkujúci na vazodilatáciu je pestrý a tak zmes fenolových metabolitov môže mať synergický účinok na vazodilatáciu.

Príkladom je kombinácia 3-(3-hydroxyfenyl)-propiónovej kyseliny s 3,4-dihydroxyfenyloctovou kyselinou, ktorá viedla k veľmi rýchlemu poklesu tlaku, avšak dochádzalo aj k rýchlemu návratu k pôvodnej hodnote krvného tlaku. Ďalšia kombinácia 3-(3-hydroxyfenyl)-propiónovej s 4-methylcatecholom viedla k menej výraznému, no za to dlhodobému poklesu arteriálneho tlaku. (Najmanová et al. 2020)

### 5.3.5. Vplyv na ischemické ochorenia srdca

Kyselina protocatechuová, presnejšie povedané jej metylovaný metabolit difunduje do mitochondrií, kde dochádza ku konjugácii s CoA. Výsledkom tohto procesu je zníženie oxidácie mastných kyselín, resp. ide o nižší pomer acylCoA/CoA, čo vedie k aktivácii pyruvátdehydrogenázy, enzýmu kľúčovému pri oxidácii sacharidov. Celý tento dej vyústi v preferenciu energetického substrátu pre srdce, ktorým sa namiesto mastných kyselín stáva



glukóza. Substitúcia energetického substrátu je vysoko prospešná v terapii ischemického ochorenia srdca. (Williamson a Clifford 2010)

### **5.3.6. Antiaterogénne účinky metabolitov**

Klinické štúdie preukázali antiaterogénnu schopnosť kyseliny protokatechuovej, kedy v skupine pacientov, ktorej bol podávaný tento fenolový metabolit, bola pozorovaná nižšia hladina celkového a VLDL cholesterolu. Predpokladá sa, že by to mohol byť výsledok indukcie pečenej TAG lipázy a cholesterol transferáz. (Williamson a Clifford 2010)

### **5.3.7. Protizápalové účinky metabolitov**

Zápal je stav v organizme, kedy dochádza ku koordinovanej aktivácii prozápalových, ale aj protizápalových mediátorov v bunke. Neliečený zápalový proces môže prechádzať do chronicity a spôsobovať poškodenie tkanív a dysfunkciu orgánov. Dá sa teda povedať, že zápal ako taký hrá kľúčovú úlohu v patofyziológii rôznych ochorení, kam okrem iného radíme diabetes mellitus alebo aj kardiovaskulárne ochorenia. (Semaming et al. 2015)

Fenolové kyseliny odvodené z mikrobiálneho metabolizmu flavonoidov sa vyznačujú taktiež protizápalovými účinkami. Popísané boli mechanizmy znižovania sekrécie niektorých cytokínov, ktoré sú spojené so zápalom, presnejšie ide o TNF- $\alpha$  a interleukíny IL-1 a IL-6. Ďalej tieto metabolity ovplyvnili indukovateľnú syntázu oxidu dusnatého (iNOS) a expresiu cyklooxygenázy-2 (COX-2). Zatiaľ čo pri monohydroxylových kyselinách ako je napríklad 3-hydroxyfenoctová kyselina alebo 4-hydroxybenzoová kyselina bolo pozorované iba významné zníženie hladiny TNF- $\alpha$ , v prípade dihydroxylových kyselín, typicky 3,4-dihydroxyfenoctová kyselina bol zaznamenaný významný pokles všetkých troch vyššie zmienených cytokínov. Vyšší účinok fenolových kyselín s dvomi hydroxylovými skupinami bol významný aj pri iných vlastnostiach metabolitov, príkladom je cytotoxicita voči nádorovým bunkám, kedy v porovnaní so 4-hydroxyfenoctovou kyselinou vykazovala 3,4-dihydroxyfenoctová kyselina silnejšie účinky. (Monagas et al. 2009)

### 5.3.8. Antihyperglykemický účinok metabolitov

Štúdie *in vivo* preukázali, že kyselina 3,4-dihydroxybenzoová znižuje hladiny glukózy v krvi a to prostredníctvom obnovenia aktivity niektorých metabolických enzýmov sacharidov, čím dochádza k zvyšovaniu hladiny inzulínu v plazme a normalizovaniu aktivity pankreatických  $\beta$  ostrovčiekov. Okrem toho je táto látka schopná zvyšovať aktiváciu PPAR $\gamma$ , vďaka čomu sa znižuje hladina LDL rezistentných častíc v adipocytoch. (Semaminbg et al. 2015)

### 5.3.9. Vplyv na karcinóm hrubého čreva a iné karcinómy

Štúdie uvádzajú, že fenolové metabolity majú vplyv na bunky rakoviny, presnejšie sa jedná o inhibíciu COX-2 v bunkách rakoviny hrubého čreva HT-29, zníženie syntézy prostanoïdov v bunkách hrubého čreva, antiproliferatívnu aktivitu v bunkách lokalizovaných v prostate, ale taktiež aj v rakovinových bunkách. Najdôležitejším zostáva, že metabolity flavonoidov ovplyvňujú bunkovú proliferáciu, apoptózu a signálne dráhy v bunkách ľudského karcinómu hrubého čreva. (Monagas et al. 2009)

Na modeli potkanov boli preukázané protektívne účinky kyseliny 3,4-dihydroxybenzoovej voči karcinogéneze, nakoľko tento fenolový metabolit zabránil orálnej karcinogéneze, karcinogéneze lokalizovanej v žalúdku, v hrubom čreve, ale aj v pečeni. Všetky tieto pokusy boli na báze indukcie silnými karcinogénmi, 4-nitrochinolín-1-oxid, N-methyl-N-nitrozomočovina alebo azoxymetán. (Williamson a Clifford 2010)

Podporné antiproliferatívne mechanizmy kyseliny protokatechuovej sú inhibícia TNF- $\alpha$ , IL-1 a IL-6, tieto vlastnosti boli dokázané na modeli poškodenia pľúc u myší a efekt bol sprostredkovaný NF- $\kappa$ B dráhou, čo je transkripčný faktor, ktorý hrá dôležitú úlohu v expresii génov kľúčových v imunitných reakciách, pri zápale ale taktiež pri bunkovom raste a v bunkovej smrti. (Safaeian et al. 2018)

Kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová vykazovala antiproliferatívnu aktivitu a inhibíciu prenylácie na bunky karcinómu prostaty. (Williamson a Clifford 2010)

Súčasnú štúdiu dokázali, že pre potenciáciu antiproliferatívneho účinku je možná kombinácia kyseliny 3,4-dihydrofenylacetovej s jej materinským flavonoidom epigalokatechín-3-gallát. (Henning et al. 2013)

Ďalšou fenolovou kyselinou, ktorá vykazuje antiproliferatívne vlastnosti je kyselina 3,4-dihydroxybenzoová, ktorá indukuje apoptózu a zabraňuje tým rastu nádoru a nádorových buniek. Pozorované boli jej účinky na bunky ľudskej leukémie (HL-60), kedy znižovala táto kyselina proteín Bcl-2 (proonkogén pôsobiaci proti apoptóze) a zvyšovala expresiu Bax (proapoptotický regulátor). Fenolový metabolit taktiež potlačoval inváziu metastáz a to u rakoviny prsníka, pľúc, pečene, krčka maternice a u karcinómu prostaty. (Semaming et al. 2015)

### **5.3.10. Antimikrobiálne účinky metabolitov**

Fenolové kyseliny majú preukázaný antimikrobiálny efekt, kedy mechanizmy zahŕňajú destabilizáciu cytoplazmatickej membrány baktérií a dochádza k zmene priepustnosti tejto membrány, taktiež inhibujú mikrobiálne enzýmy, čo má za následok priamy zásah do metabolizmu baktérií a ovplyvnenia substrátov potrebných na rast mikróbov. (Liu et al. 2020)

*In vitro* štúdie dokázali, že kyselina 3,4-dihydrobenzoová má antimikrobiálne účinky. Efekt bol preukázaný proti gram pozitívnym a gram negatívnym baktériám, ale aj proti hubám. Tieto účinky má fenolová kyselina na báze inhibície rastu baktérií, čím môže taktiež synergicky podporovať účinky antibiotickej terapie, čo môže napomáhať k zníženiu rizika antibiotickej rezistencie. (Semaming et al. 2015)

## 5.4. Železo

### 5.4.1. Železo ako esenciálny prvok v ľudskom organizme

Železo je nevyhnutým prvkom pre prežitie všetkých organizmov na svete. Tento prvok hrá kľúčovú úlohu v nevyhnutných procesoch v organizme. Je dôležité pre transport kyslíka pomocou hemoglobínu, okysličovanie svalstva pomocou myoglobínu, ale taktiež je esenciálny pri bunkovom dýchaní, produkcii ATP (adenozíntrifosfát) a syntéze DNA. Je súčasťou rady enzymaticky riadených reakcií v cytozole, ale aj v iných bunkových kompartmentoch. (Galaris et al. 2019)

Súčasťou vyššie spomínaných reakcií je železo primárne na základe jeho schopnosti darovať a prijímať elektrón, a tak prechádzať medzi formami železnatých ( $\text{Fe}^{2+}$ ) a železitých ( $\text{Fe}^{3+}$ ) kationov. Táto jeho schopnosť však má aj negatíva, keďže za určitých podmienok môže železo vytvárať voľné radikály, ktoré sú pre organizmus škodlivé. Celkový obsah železa u priemerného dobre živeného človeka je 3-5 g. Pričom približne 60 % z neho je inkorporovaného v hemoglobíne, 10 % v myoglobíne lokalizovanom vo svalstve a zvyšný obsah železa je uložený v hepatocytoch v pečeni a retikuloendotelových makrofágoch. Denný príjem železa z potravy je od 1 do 2 mg, nakoľko organizmus pomocou regulačných systémov je schopný kompenzovať bežné straty železa, ktoré sa taktiež pohybujú v rozmedzí 1-2 mg. Do bežných strát železa sa počíta potenie, strata krvi, odlupovanie črevných a ďalších epiteliálnych buniek a deskvamácia. (Chifman et al. 2014)

Dysreguláciou metabolizmu železa dochádza k nevhodne vysokým alebo nízkym hladinám železa, čo prispieva k rozvoju celej škály ochorení. Nedostatok bunkového železa inhibuje rast buniek a vo finále vedie k bunkovej smrti. (Mladěnka et al. 2005)

### 5.4.2. Kinetika železa v organizme

Železo je v potrave prítomné vo dvoch formách a to buď ako hem alebo ako anorganického (väčšinou  $\text{Fe}^{3+}$ ióny), ktoré sú naviazané na molekulu. Nakoľko telo nie je schopné vstrebávať  $\text{Fe}^{3+}$ , je nutná transformácia iónov na  $\text{Fe}^{2+}$ , ktoré je organizmus schopný absorbovať. Vstrebávanie železa prebieha v klkoch tenkého čreva, presnejšie je jeho absorpcia

lokalizovaná v gastroduodenálnom spojení, kde je pH stále dostatočne nízke, čo napomáha uvoľneniu železa z potravy. Premena  $\text{Fe}^{3+}$  na  $\text{Fe}^{2+}$  prebieha na apikálnej membráne v tenkom čreve a je uskutočnená pomocou cytochrómu b reduktázy alebo pasívne pomocou redukčných činidiel ako je vitamín C. Následne sú ióny vstrebávané pomocou transportéru katiónov kovov (DMT-1), kedy okrem  $\text{Fe}^{2+}$  sú prenášané tiež  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ , ale aj  $\text{Pb}^{2+}$ . Zaujímavé je, že medzi kovy prenášané týmto transportérom nepatria  $\text{Mg}^{2+}$  ani  $\text{Ca}^{2+}$ . Expresia DMT-1 je upregulovaná v prípade nedostatku železa. Po vstrebaní  $\text{Fe}^{2+}$  iónov sú viazané na transferín (Tf), čo je hlavný nosič železa v organizme. Transferín je schopný pojať približne 3 mg železa v tele. Apotransferín je proteín s dvomi väzobnými miestami, ktoré sú schopné viazať  $\text{Fe}^{3+}$ , zatiaľ čo k tým  $\text{Fe}^{2+}$  majú veľmi nízku afinitu. Železo inkorporované v transferíne prechádza do buniek pomocou receptora lokalizovaného na membráne buniek, označovaného ako transferín-receptor 1 (TfR1). Popri TfR1 existuje aj transferín-receptor 2 (TfR2), ktorého úloha v organizme je nejasná, predpokladá sa, že hrá kľúčovú úlohu v regulácii železa. Naviazaním transferínu na receptor dochádza k endocytóze celého komplexu. Vzniknutý endozóm je následne okyselený ATP dependnou protónovou pumpou, čo má za následok premenu  $\text{Fe}^{3+}$  na  $\text{Fe}^{2+}$  ióny a uvoľnenie železa z komplexu, nakoľko iba  $\text{Fe}^{2+}$  ióny sú schopné prechádzať cez membránu cez DMT-1 do cytoplazmy. V bunkách môže byť železo transportované do mitochondrií, kde sa podieľa na syntéze hemu alebo súčasťou Fe-S klastrov. (Mladěnka et al. 2005)

Okrem transferínu samozrejme existujú aj iné formy viazania železa, napríklad feritín. Tento proteín má 24 podjednotiek a je zložený z proteínového obalu a jadra, kde je železo uložené vo forme kryštálu ferihydrítu ( $\text{FeOOH}$ )<sub>x</sub>. Jadro je takto schopné viazať až 4500 atómov železa, avšak zvyčajne je tu lokalizovaných iba približne 2000 atómov železa. Ferihydrít vzniká v procese oxidácie feroxidázou  $\text{Fe}^{3+}$  iónov, ktoré prechádzajú cez póry v bielkovinovom obale až do jadra. V prípade ak je železo v tele potrebné, je možné ho jednoducho uvoľniť z kryštálu ferihydrítu. Mechanizmus akým je železo, ktoré je inkorporované v transferíne uvoľňované nie je úplne známe, predpokladá sa však, že dôležitú úlohu v tomto procese zohráva transmembránový proteín označovaný ako ferroportín 1 (MTP1, proteín transportujúci kov 1). Naznačuje to aj fakt, že nadmerná expresia ferroportínu 1 v tkanivových kultúrach spôsobuje vyčerpanie vnútrobunkových zásob železa. Ferroportín 1 pravdepodobne pôsobí aj ako železitá reduktáza, nakoľko  $\text{Fe}^{3+}$  ióny musia byť najprv zredukované na  $\text{Fe}^{2+}$  a až potom môžu byť transportované z bunky do systémového obehu. (Mladěnka et al. 2005)

Významným rezervoárom železa v ľudskom organizme je pečeň, kde je väčšina železa uloženého vo forme ferritínu. Ak sa v sére prekročí väzobná kapacita pre železo viazané na transferín, pečeň sa stáva hlavným úložiskom železa. Z tohto úložiska môže byť železo kedykoľvek na základe požiadaviek organizmu mobilizované. Ďalšími úložiskami železa je slezina, kostná dreň a črevná sliznica. (Chifman et al. 2014)

Hemosiderín okrem železa obsahuje aj bielkoviny, sacharidy a lipidy. Je lokalizovaný v bunkách, presnejšie v siderozómoch, v lyzozómoch obsahujúcich železo. Táto forma uloženého železa je nestabilná, kvôli riziku železom indukovanej peroxidácii lipidov lokalizovaných v lyzozomálnej membráne. Železo môže byť v tele prítomné aj v inej forme ako iba viazané na proteíny. Pod označením neproteínové železo je známe železo vo forme citrátu a citrát-acetátového komplexu. (Mladěnka et al. 2005)

Železo je súčasťou hemoglobínu, červeného krvného farbiva lokalizovaného v krvinkách. Degradácia hemoglobínu na konci života červených krviniek je sprostredkovaná slezinovými makrofágmi. Z hemoglobínu sa následne uvoľňuje železo pomocou hemoxygenázy, exportuje sa do plazmy prostredníctvom ferroportínu 1, ktoré sa opätovne viaže na transferín v krvnom obeh. (Chifman et al. 2014)

### **5.4.3. Regulácia homeostázy**

Organizmus má na udržanie homeostázy železa prepracovaný systém príjmu, skladovania, využitia a recyklácie železa. Z veľkej časti zabezpečuje udržanie správnej hladiny železa hormón hepcidín, ktorý spolu s cieľom jeho regulácie ferroportínom 1 zabezpečujú systémovú homeostázu železa. (Chifman et al. 2014)

Väzba hepcidínu na ferroportín 1 ovplyvňuje degradáciu železa v lyzozómoch, ale obmedzuje aj vstup železa do plazmy a tým udržuje železo v cieľových tkanivách. Expresia proteínu hepcidínu je indukovaná železom alebo zápalovým procesom. Nakoľko príjem železa stimuluje hepcidín ako prevencia hyperferémie a inhibuje ďalšie vstrebávanie železa. Zápalový proces indukuje hepcidín z dôvodu podpory hypoferémie, a jeho hromadenie v tkanivách, u ktorých sa predpokladá, že budú organizmus chrániť pred infekciou. Naopak jeho aktivita je inhibovaná nedostatkom železa alebo v prípade vysokej erytropoetickej potreby, kedy je nutná zvýšená mobilizácia železa. (Galaris et al. 2019)

#### 5.4.4 Ochorenia

Porucha homeostázy či už smerom k nedostatku alebo prebytku železa v organizme spôsobuje celú radu ochorení, ktoré môžu byť získané alebo dedičné. Príčinou môže byť prítomnosť mutovaného génu, strava s nedostatočným, alebo nadmerným množstvom železa, krvné transfúzie, nadmerné krvné straty, hemolýza alebo porucha príjmu a vstrebávania železa v čreve. (Chifman et al. 2014)

Neprimerane vysoké hladiny železa v organizme vedú k jeho ukladaniu v životne dôležitých orgánoch, jedná sa o pečeň, srdce, pankreas alebo endokrinné žľazy. Toto nadmerné hromadenie železa vedie k tvorbe hydroxylových alebo lipidových radikálov, ktoré sú pre organizmus rizikové, nakoľko môže dochádzať k poškodeniu proteínov, DNA, bunkových membrán radikálmi a toto poškodenie môže viesť až k bunkovej smrti. Chronicky zvýšené hladiny železa tým pádom môžu spôsobovať rozvoj rady patologických stavov, kam radíme cirhózu pečene, rakovinu, hypogonadizmus, artritída, srdcové arytmie, srdcové zlyhanie, degeneráciu sietnice, diabetes mellitus a neurodegeneratívne ochorenia. (Chifman et al. 2014)

Nedostatok železa je taktiež patologický stav, nakoľko ide o hlavnú príčinu anémie. Približne dve tretiny celkového množstva železa v tele sa zúčastňuje syntézy hemoglobínu. Nedostatok železa priamo ovplyvňuje tvorbu zdravých červených krviniek. (Chifman et al. 2014)

#### 5.4.5. Fentonova reakcia a železo

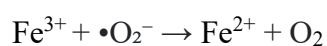
Železo vďaka svojim redoxným schopnostiam je dôležitým participantom v rôznych biologických reakciách. Avšak okrem významného benefitu, je táto redoxná schopnosť železa aj rizikovou, nakoľko sa vďaka tomu železo prejavuje ako katalyzátor tvorby reaktívnych voľných radikálov. Kvôli tomuto riziku je cirkulujúce železo v organizme viazané na transferín, ktorý ho udržuje v redoxne inertnom stave. Intracelulárne je železo taktiež chránené, pretože je uložené buď vo feritíne, alebo je dobre chránené pomocou jeho väzby na aktívne miesto enzýmov. (Galaris et al. 2019)

Primárnym reaktívnym kyslíkovým medziproduktom vznikajúcim takmer v každej reakcii súvisiacej s oxidačným stresom je superoxid ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), ktorý sa však rýchlo premieňa na  $\text{H}_2\text{O}_2$  pôsobením superoxiddisnutázy. Je však známe, že ani pôvodný medziprodukt  $\bullet\text{O}_2^-$  a ani  $\text{H}_2\text{O}_2$  nie sú príliš silné oxidačné činidlá a jediné s čím môžu priamo interagovať je železo alebo molekuly, ktoré obsahujú železo. V prítomnosti nechránených redoxne aktívnych iónov železa dochádza k Fentonovej reakcii, kedy dochádza k vzniku extrémne reaktívneho hydroxylového radikálu  $\bullet\text{OH}$  cez ferrylový alebo perferrylový medziprodukt (Reakcia č. 1). Túto reakciu sú schopné katalyzovať ešte efektívnejšie ako železo, napr. meď. V prítomnosti  $\bullet\text{O}_2^-$  môže dochádzať k redukcii železitých iónov na železnaté (Reakcia č. 2). (Galaris a Pantopoulos 2008)

### Reakcia č. 1



### Reakcia č. 2



Hlavný produkt Fentonovej reakcie, hydroxylový radikál, je extrémne reaktívny, avšak má krátku životnosť. Môže oxidovať akékoľvek chemické štruktúry v blízkosti svojho vzniku (reaktivita riadená difúziou). V praxi to znamená, že ak je železo viazané na membránové fosfolipidy, tak *de novo* vzniknutý hydroxylový radikál spôsobuje peroxidáciu lipidov, ktorá je úzko spojená s nekrotickým alebo ferroptickým typom bunkovej smrti. Železo naviazané na DNA môže pomocou Fentonovej reakcie indukovať mutácie alebo jednoduché či dvojité zlomy vlákien DNA. Rizikové však kvôli oxidačnému poškodeniu nie je železo ako také, ale skôr jeho voľná labilná frakcia nenaviazaná na transferrín, označovaná aj ako NTBI (non-transferrin bound iron). Táto frakcia železa sa hromadí pri patologických stavoch a je ľahko prijímaná hepatocytmi, ako aj inými tkanivovými parenchymálnymi bunkami prostredníctvom zinkového transportéra ZIP14. (Galaris et al. 2019)

Labilné železo je oproti tomu viazanému na transferrín redoxne aktívne, čo prispieva k premene relatívne stabilných peroxidov na extrémne reaktívne hydroxylové radikály. Medzi jeho ďalšie vlastnosti však patrí aj schopnosť byť chelátované pomocou chelatačných zlúčenín,



väčšinou nízkomolekulárných látok ako je citrát v plazme, glutathión v cytosóle, ďalšími možnými ligandmi pre železo sú ATP, ADP, acetát, pyruvát, fosfáty alebo albumín. (Galaris et al. 2019)

#### 5.4.6. Chelatácia železa

Ideálny chelátor na stabilizáciu Fentonovej reakcie musí stabilizovať železo, tak by bolo inertné voči oxidácii  $H_2O_2$ , alebo redukcii redukčnými látkami. Najstaršie používaným chelátorom železa je desferrioxamín, siderofor z triedy hydroxamátov. Látka má preukázanú účinnosť aj bezpečnosť v klinickom užívaní, avšak medzi jej nevýhody sa radí nízku perorálnu absorpciu na základe jej hydrofilnosti a krátky biologický poločas, ktorý činí zhruba 20 minút. Znamená to, že na dosiahnutie účinnej koncentrácie sa v praxi využíva parenterálne podanie s prenosnou infúznou pumpou na 4-5 dní vždy aspoň na 8-10 hodín. Opačom tohto hydrofilného chelátora sú lipofilné chelátory železa ako je napríklad deferiprón a defasirox. V prípade defasiroxu musia byť prítomné 2 chelátorové molekuly, aby bolo dosiahnuté úplné naviazanie jedného iónu železa. U deferiprónu sú potrebné molekuly až tri. Neúplná koordinácia *in vivo* môže byť spojená s nariedením chelatačného činidla v tele, čo zdôrazňuje, že chelatačné činidlo by malo byť vždy v molekulárnom nadbytku, aby bolo schopné inhibovať interakciu železa s peroxidom a tým zamedzovať tvorbu radikálov. Napriek tomu aj čiastočná koordinácia labilného železa chelátorom zamedzuje tejto interakcii, čím taktiež zabraňuje tvorbe radikálov. Chelatácia železa sa používa v praxi už viac ako 40 rokov, avšak terapia je stále obmedzená iba na transfúzne preťaženie organizmu železom. Avšak na základe jeho mechanizmu pôsobenia v tele, by mohla v budúcnosti zameraná aj na zamedzenie oxidačného stresu. (Galaris et al. 2019)

#### 5.4.7 Flavonoidy a chelatácia železa

Flavonoidné látky majú rôzne mechanizmy, akými môžu pôsobiť antioxidantne. Jedným z nich je aj ich schopnosť chelátovať redoxne aktívne ióny, medzi ktoré radíme aj železo. Kľúčové faktory, ktoré ovplyvňujú biologickú aktivitu flavonoidov je rozsah, typ a počet substituentov a celkový počet hydroxylových skupín. Prítomnosť oboch hydroxylových skupín

v kruhu B a 5-hydroxyskupina na kruhu A sú podmienky pre schopnosť flavonoidov chelatovať redoxne aktívne kovy a tým aj zabrániť rozkladu peroxidu vodíka a vzniku hydroxylového radikálu. Avšak za určitých podmienok ako je napríklad vysoká koncentrácia flavonoidov, prítomnosť redoxne aktívneho kovy (železo alebo meď), vysoké pH sa môže antioxidačné flavonoidy stať prooxidantmi. (Valko et al. 2006)

## 6. Experimentálna časť

### 6.1. Použité prístroje, pomôcky a chemikálie

#### 6.1.1. Prístroje

- pumpa ESA model 582 (ESA, Massachusetts, USA)
- coulometrický detektor Coulochem III (ESA, Massachusetts, USA)
- monolitická HPLC (high-performance liquid chromatography) kolona Onyx C8 - 100 x 4.6 mm (Phenomenex, Kalifornie, USA)
- analytické váhy Kern ALT 220-4NM (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Nemecko)
- vortex mixér IKA® Vortex Genius 3 (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Nemecko)

#### 6.1.2. Pomôcky

- mikrostriekačka – 50 µL (Hamilton Company, Nevada, USA)
- automatické jednokanálové pipety 0-100, 20-200, 100, 1000 µl (Brand, Nemecko)
- mikroskúmavky – 1,5 ml (Eppendorf, Nemecko)
- špičky k pipetám o objeme 200 µl, 1000 µl a 5 ml (Eppendorf, Nemecko)
- skúmavky centrifugačné – 15 ml a 50 ml (Brand, Nemecko)

#### 6.1.3. Chemikálie

- chlorid železitý (FeCl<sub>3</sub>) (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- testované látky:
  - benzoová kyselina (Sigma-Aldrich, Nemecko)
  - 3-hydroxybenzoová kyselina (Sigma-Aldrich, Nemecko)
  - 4-hydroxybenzoová kyselina (Sigma-Aldrich, Nemecko)
  - 2,4-dihydroxybenzoová kyselina (Sigma-Aldrich, Nemecko)

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

#### 6.1.4. Chemikálie na prípravu pufrov

- octan sodný bezvodý ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) (Penta, ČR)
- kyselina octová ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) (Penta, ČR)
- tris(hydroxymethyl)aminometán (TRIS) (Sigma-Aldrich, Nemecko)

#### 6.1.5. Ďalšie látky

- salicylová kyselina (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- disodná soľ etyléndiamintetraoctovej kyseliny ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , 30%) (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- fosforečná kyselina ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 85%) (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- katechol (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- 2,3-dihydroxybenzoová kyselina (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- 2,5-dihydroxybenzoová kyselina (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- trietylamín (Sigma-Aldrich, Nemecko)chlorovodíková kyselina ( $\text{HCl}$ , 35%) (Penta, ČR)

#### 6.1.6. Rozpúšťadlá

- methanol (Fisher Chemical, UK)
- acetonitril (Fisher Chemical, UK)
- superčistá voda bola pripravená pomocou prístroja Milli-Q RG (Merck Millipore, Massachusetts, USA)

## 6.2. Metodika práce

### 6.2.1. Príprava zásobných roztokov

Vodný roztok  $\text{Fe}^{3+}$  (5 mM  $\text{FeCl}_3$ ) sa pripravil rozpustením príslušného množstva  $\text{FeCl}_3$  v ultračistej vode.

5 mM roztoky testovaných látok boli pripravené rozpustením príslušného množstva daných látok v methanole. Následne v priebehu samotného experimentu boli nariadené na príslušné koncentrácie.

66,67 mM roztok kyseliny salicylovej bol pripravený rozpustením potrebného množstva kyselina salicylovej v methanole.

Pufor s pH 4,5 bol pripravený zmiešaním vodných roztokov 27,3 mM kyseliny octovej a 15 mM octanu sodného.

Pufor s pH 7,5 bol pripravený rozpustením potrebného množstva TRIS vo vode za vzniku 5 mM TRIS.

10 mM roztoky štandardov resp. katecholu, kyseliny 2,3-dihydroxybenzoovej, kyseliny 2,5-dihydroxybenzoovej vznikli rozpustením príslušného množstva vo vode.

### 6.2.2. Príprava roztokov využitých v experimente

Štandardy boli pripravené v mikroskúmavke zmiešaním 27  $\mu\text{l}$  10  $\mu\text{M}$  vodného roztoku katecholu, 130  $\mu\text{l}$  1  $\mu\text{M}$  vodného roztoku 2,3-dihydroxybenzoovej kyseliny, 130  $\mu\text{l}$  1  $\mu\text{M}$  vodného roztoku 2,5-dihydroxybenzoovej kyseliny a 713  $\mu\text{l}$  vody.

Kontrolné vzorky boli pripravené v mikroskúmavke zmiešaním 700  $\mu\text{L}$  pufru s pH 4,5 alebo 7,5; 200  $\mu\text{l}$  methanolu, 50  $\mu\text{l}$  1 mM  $\text{Fe}^{3+}$ , 45  $\mu\text{l}$  66,67 mM methanolového roztoku kyseliny salicylovej a 5  $\mu\text{l}$  30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Roztoky testovaných látok boli pripravené zriedením 5 mM zásobného roztoku príslušnej benzoovej kyseliny potrebným množstvom methanolu za vzniku týchto koncentrácií: 1,25  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$ , 12,5  $\mu\text{M}$ , 125  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$ , 2,5 mM, 5 mM.

Roztok železa (1 mM FeCl<sub>3</sub>) vznikol nariadením zásobného roztoku FeCl<sub>3</sub> pridaním potrebného množstva ultračistej vody.

Testované vzorky boli pripravené v mikroskúmavke zmiešaním 700 µl pufru s pH 4,5 alebo 7,5; 200 µl testovanej látky s príslušnou koncentráciou, 50 µl 1 mM Fe<sup>3+</sup>, 45 µl 66,67 mM methanolového roztoku kyseliny salicylovej a 5 µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 6.2.3. Príprava mobilnej fázy

Príprava 5 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pufru v kadičke bolo zmiešaných 68 µl kyseliny fosforečnej a 199,932 ml vody. Následne bolo pridaných 10 ml 20 nM EDTA vo vode. Pomocou trietylamínu bolo nastavené pH roztoku na 2,85. Takto vzniknutý roztok bol prefiltrovaný pomocou aparatury na vákuovú filtráciu.

V odmernej banke bol zmiešaný pripravený H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pufr (pH 2,85) a acetonitril v pomere 93:7. Následne bola táto mobilná fáza ponechaná 5 minút v ultrazvukovom kúpeli.

### 6.2.4. Priebeh experimentu

1. Bol pripravený 1 mM roztok FeCl<sub>3</sub> vo vode.
2. Roztoky benzoových kyselín boli pripravené v mikroskúmavkách nariadením zásobných roztokov na príslušné koncentrácie tj. 1,25 µM, 2,5 µM, 12,5 µM, 125 µM, 250 µM, 500 µM, 2,5 mM, 5 mM.
3. HPLC prístroj bol nastavený v izokratickom režime s prietokovou rýchlosťou 1,0 ml/min.
4. Následne boli v mikroskúmavke zmiešané 27 µl 10 µM roztok katecholu, 130 µl 1 µM roztok 2,3-dihydroxybenzoovej kyseliny, 130 µl 1 µM roztok 2,5-dihydroxybenzoovej kyseliny a 713 µl vody.
5. Z pripravenej zmesi bolo odobraných 20 µl pomocou Hamiltonovej striekačky a aplikovaných do HPLC, po ukončení analýzy boli zmerané veľkosti plochy vzniknutých pík.

6. Postup prípravy zmesi (bod 4) a analýzy pomocou HPLC (bod 5) bol opakovaný trikrát. Výsledné plochy píkov boli následne spriemerované.
7. Zmiešaním 700  $\mu\text{L}$  pufru s pH 4,5 alebo 7,5; 200  $\mu\text{l}$  methanolu, 50  $\mu\text{l}$  1 mM  $\text{Fe}^{3+}$ , 45  $\mu\text{l}$  66,67 mM methanolového roztoku kyseliny salicylovej a 5  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  bola pripravená kontrolná vzorka.
8. Po pridaní  $\text{H}_2\text{O}_2$  začala v mikroskúmavke prebiehať Fentonova reakcia, ktorá takto bežala 3 minúty za stáleho miešania.
9. Po uplynutí 3 minút bolo z mikroskúmavky odobraných Hamiltonovou striekačkou 20  $\mu\text{l}$  a aplikovaných do HPLC a následne boli zmerané veľkosti plôch píkov. Výsledné hodnoty odrážali plochy píkov katecholu, 2,3-dihydroxybenzoovej kyseliny a 2,5-dihydroxybenzoovej kyseliny.
10. Postup prípravy a analýzy kontrolných vzorkou (body 7,8,9) bol opakovaný trikrát a výsledné hodnoty boli spriemerované.
11. Následne boli pripravené v mikroskúmavke zmiešaním 700  $\mu\text{l}$  pufru s pH 4,5 alebo 7,5; 200  $\mu\text{l}$  testovanej látky s príslušnou koncentráciou, 50  $\mu\text{l}$  1 mM  $\text{Fe}^{3+}$ , 45  $\mu\text{l}$  66,67 mM methanolového roztoku kyseliny salicylovej a 5  $\mu\text{l}$  30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  testované vzorky. Výsledné pomery koncentrácií benzoovej kyseliny k iónom železa boli: 1:0,005; 1:0,01; 1:0,05; 1: 0,5; 1:1; 1:2; 1:10 a 1:20
12. Pridaním posledného komponentu tj. 5  $\mu\text{l}$  30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  začala prebiehať v mikroskúmavke Fentonova reakcia, ktorá za stáleho miešania prebiehala 3 minúty
13. Po uplynutí 3 minút bolo pomocou Hamiltonovej striekačky odobraných 20  $\mu\text{l}$ , aplikovaných do HPLC, kde prebiehala analýza.
14. Po ukončení analýzy boli zmerané a zaznamenané veľkosti plôch píkov.
15. Príprava vzorkou (body 11, 12) a proces analýzy pomocou HPLC (body 13, 14) bol s každou príslušnou koncentráciou testovanej látky vykonaný trikrát a výsledné plochy píkov boli následne zaznamenané.
16. Na základe zaznamenaných hodnôt plôch píkov boli vytvorené grafy, ktoré odrážali antioxidačné alebo prooxidačné vlastnosti testovaných látok.

### 6.2.5. Matematické a štatistické vyhodnotenie

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

Výsledky sú prezentované ako priemer  $\pm$  smerodatná odchýlka vypočítaná podľa vzorca  $\sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n-1}}$ . Štatistické porovnanie produkcie hydroxylových radikálov bolo uskutočnené použitím testu ANOVA následovaného Dunnettovým post-hoc testem.

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

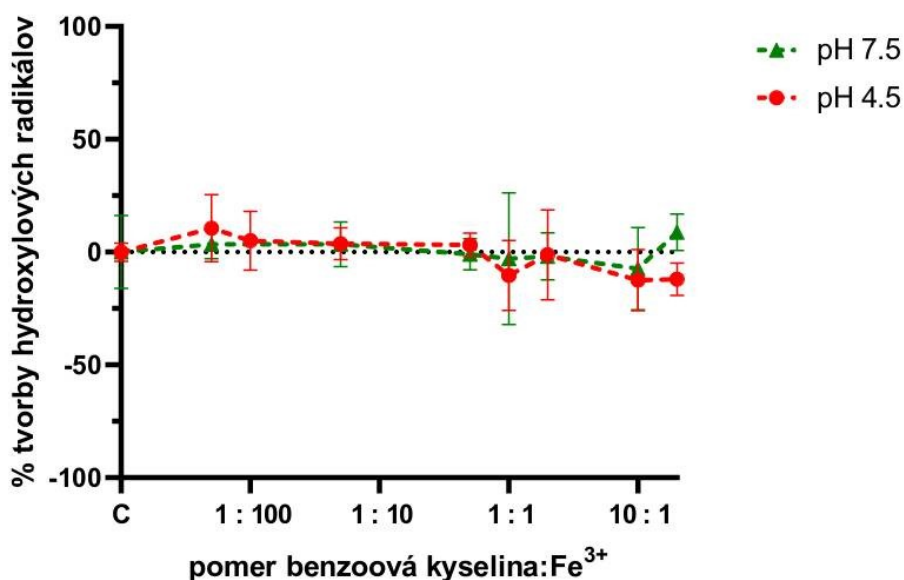


## 7. Výsledky

Výsledné grafy zobrazujú vplyv jednotlivých testovaných benzoových kyselín v koncentráciách 1,25  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$ , 12,5  $\mu\text{M}$ , 125  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$ , 2,5 mM, 5 mM na Fentonovu reakciu pri pH 4,5 a 7,5. Pre lepšiu orientáciu sú v grafoch tieto hodnoty ako koncentračné pomery testovanej látky k pridaným železitým iónom. Záporné hodnoty na ose Y znázorňujú zníženú produkciu hydroxylových radikálov, čiže sa bude jednať o antioxidačné vlastnosti. Kladné hodnoty na ose Y zobrazujú zvýšenú tvorbu hydroxylových radikálov, resp. prooxidačné vlastnosti danej benzoovej kyseliny.

### 7.1. Vplyv kyseliny benzoovej na železom katalyzovanú Fentonovu reakciu

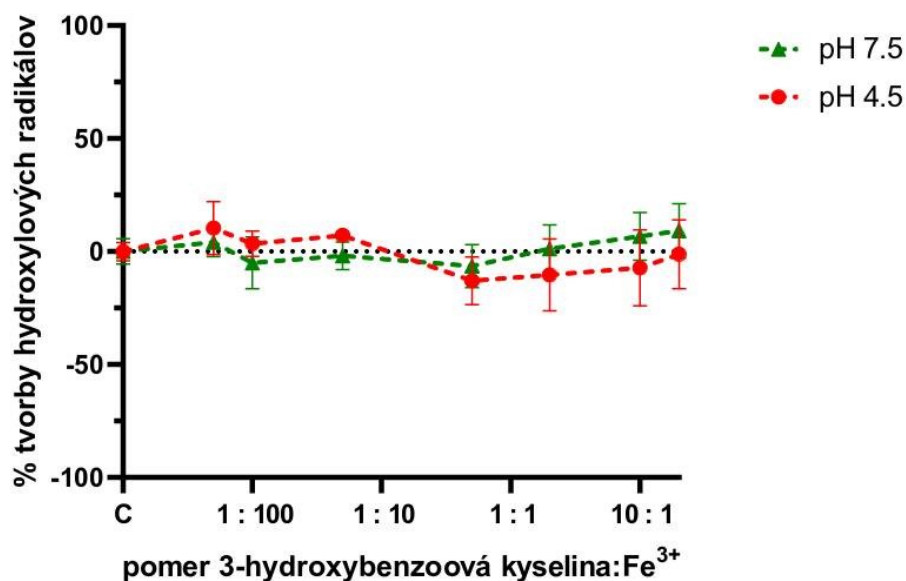
Z grafu (obr. 11) je zrejmé, že kyselina benzoová neoplýva antioxidačnými alebo prooxidačnými vlastnosťami, nakoľko táto kyselina nespôsobila ani pri jednom z meraných pH štatisticky významný pokles alebo nárast v tvorbe hydroxylových radikálov.



Obr. 11 Vplyv benzoovej kyseliny na železom katalyzovanú Fentonovu reakciu. Finálna koncentrácia  $\text{Fe}^{3+}$  iónov bola vždy 5 mM (pomer benzoovej kyseliny k  $\text{Fe}^{3+}$  20:1). V žiadnom pomere nebol pozorovaný štatisticky významný rozdiel pri porovnaní s kontrolnou slepou vzorkou (C).

## 7.2. Vplyv kyseliny 3-hydroxybenzoovej na železom katalyzovanú Fentonovu reakciu

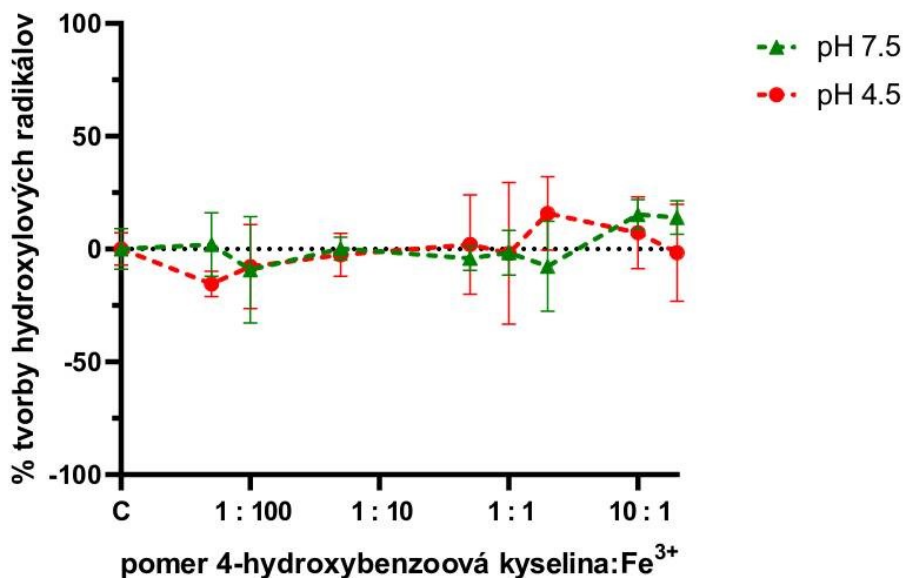
Na grafe (obr. 12) môžeme vidieť, že kyselina 3-hydroxybenzoová taktiež neprejavuje antioxidačné alebo prooxidačné vlastnosti ani pri jednom z meraných pH. Výkyvy do kladných alebo záporných hodnôt tj. sú štatisticky zanedbateľné.



Obr. 12 Vplyv 3-hydroxybenzoovej kyseliny na železom katalyzovanú Fentonovu reakciu. Finálna koncentrácia Fe<sup>3+</sup> iónov bola vždy 5 mM (poměr 3-hydroxybenzoovej kyseliny k Fe<sup>3+</sup> 20:1). V žiadnom pomere nebol pozorovaný štatisticky významný rozdiel pri porovnaní s kontrolnou slepou vzorkou (C).

## 7.3. Vplyv kyseliny 4-hydroxybenzoovej na železom katalyzovanú Fentonovu reakciu

Na grafe kyselina 4-hydroxybenzoovej (obr. 13) nie je vidno žiadne štatisticky významné výkyvy od nulovej hodnoty. Znamená to, že kyselina 4-hydroxybenzoová nemá antioxidačné a ani prooxidačné vlastnosti.

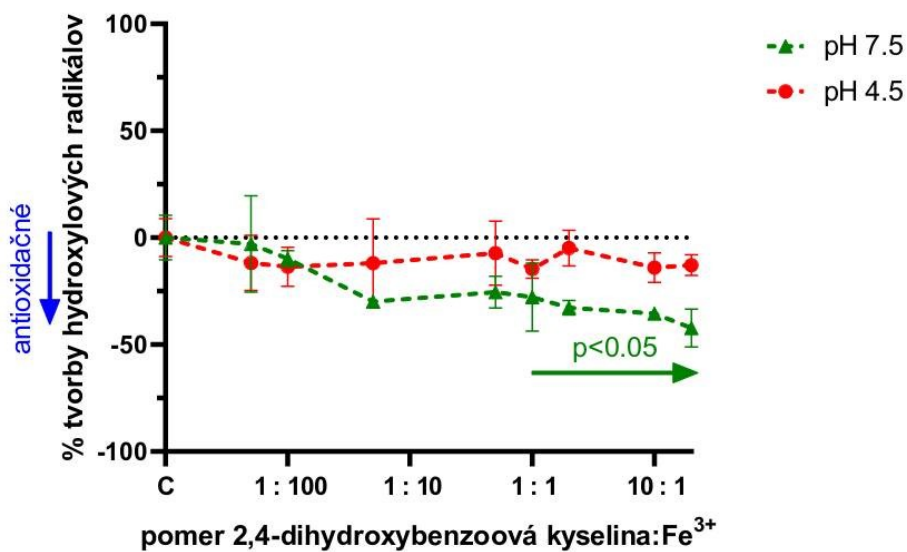


Obr. 13 Vplyv 4-hydroxybenzoovej kyseliny na železom katalyzovanú Fentonovu reakciu. Finálna koncentrácia  $Fe^{3+}$  iónov bola vždy 5 mM (pomer 4-hydroxybenzoovej kyseliny k  $Fe^{3+}$  20:1). V žiadnom pomere nebol pozorovaný štatisticky významný rozdiel pri porovnaní s kontrolnou slepou vzorkou (C).

#### 7.4. Vplyv kyseliny 2,4-dihydroxybenzoovej na železom katalyzovanú Fentonovu reakciu

Na grafe (obr. 14) môžeme vidieť, že so zvyšujúcou sa koncentráciou kyseliny 2,4-dihydroxybenzoovej pri pH 7,5 dochádza k štatisticky významnému zníženiu produkcie hydroxylových radikálov, čo značí antioxidačné vlastnosti kyseliny 2,4-dihydroxybenzoovej. Pri pomere kyseliny 2,4-dihydroxybenzoovej k:Fe<sup>3+</sup>) 20:1 (5 mM kyselina 2,4-dihydroxybenzoová) došlo k najvýraznejšiemu zníženiu tvorby hydroxylových radikálov. Významný pokles bol ale pozorovaný už od pomeru 1:1, tj. koncentrácia tejto kyseliny 250 μM.

Pri pH 4,5 nedošlo k žiadnemu štatisticky významnému poklesu alebo zvýšeniu produkcie hydroxylových radikálov.

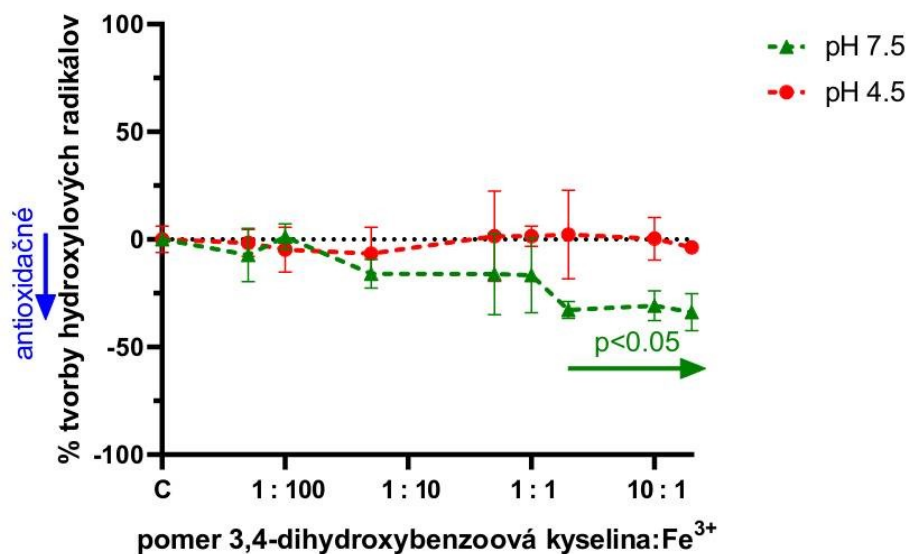


Obr. 14 Vplyv 2,4-dihydroxybenzoovej kyseliny na železom katalyzovanú Fentonovu reakciu. Finálna koncentrácia  $Fe^{3+}$  iónov bola vždy 5 mM (pomer 2,4-dihydroxybenzoovej kyseliny k  $Fe^{3+}$  20:1). Zelená šípka označuje všetky body, ktoré boli štatisticky významne odlišné od pozitívnej kontroly (C), tj. vzorku ktorý sa líšil iba absenciou testovanej látky, pri pH 7,5.

### 7.5. Vplyv kyseliny 3,4-dihydroxybenzoovej na železom katalyzovanú Fentonovu reakciu

Na grafe s kyselinou 3,4-dihydroxybenzoovou (obr. 15) môžeme vidieť štatisticky významný pokles produkcie hydroxylových radikálov pri pH 7,5. Antioxidačné vlasti tejto kyseliny sa výraznejšie prejavujú pri zvyšujúcej sa koncentracií, kedy najvyššie hodnoty poklesu tvorbu hydroxylových radikálov dosahujú pri pomere 20:1 (5 mM kyselina 3,4-dihydroxybenzoová). Významného poklesu hydroxylového radikálu bolo dosiahnutého ale už od pomeru 2:1, tj. koncentrácia tejto kyseliny 500  $\mu$ M.

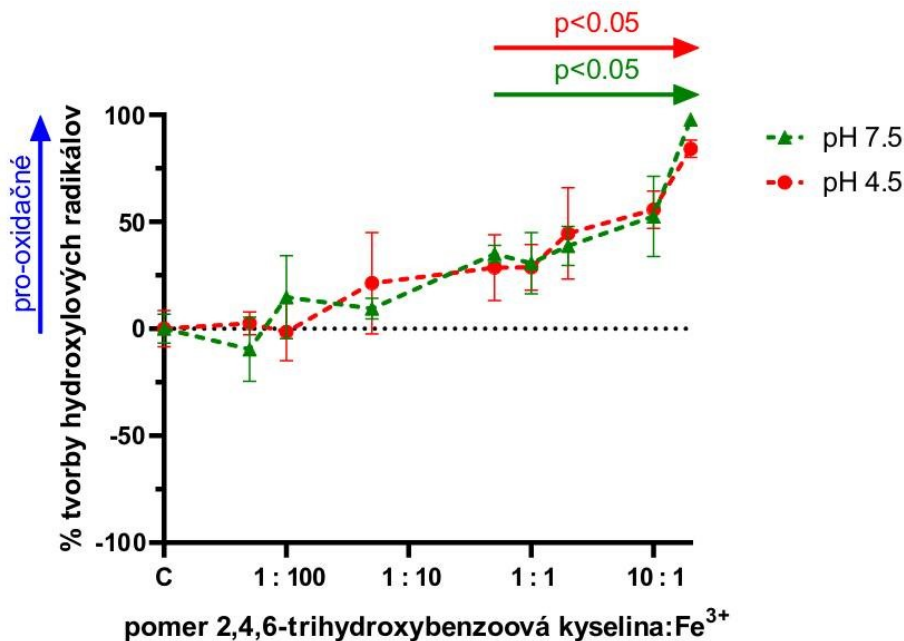
Pri pH 4,5 nepozorujeme žiadne štatisticky významné výkyvy smerom k zníženiu alebo zvýšeniu produkcie hydroxylových radikálov.



Obr. 15 Vplyv 3,4-dihydroxybenzoovej kyseliny na železom katalyzovanú Fentonovu reakciu. Finálna koncentrácia  $Fe^{3+}$  iónov bola vždy 5 mM (pomer 3,4-dihydroxybenzoovej kyseliny k  $Fe^{3+}$  20:1). Zelená šípka označuje všetky body, ktoré boli štatisticky významne odlišné od pozitívnej kontroly (C), tj. vzorku ktorý sa líšil iba absenciou testovanej látky pri pH 7,5.

## 7.6. Vplyv kyseliny 2,4,6-trihydroxybenzoovej na železom katalyzovanú Fentonovu reakciu

Na obrázku 16 vidíme štatisticky významný nárast produkcie hydroxylových radikálov pri oboch meraných pH. Produkcia radikálov sa zvyšuje s rastúcou koncentráciou kyseliny 2,4,6-trihydroxybenzoovej a pri najvyššej meranej koncentrácii 20:1 (5 mM kyselina 2,4,3-trihydroxybenzoová) dosahuje najvyššie hodnoty produkcie radikálov, kedy sa toto číslo blíži k 100%. Môžeme teda povedať, že kyselina 2,4,6-trihydroxybenzoová má pri oboch meraných pH (tj. pH 4,5 a 7,5) výrazné prooxidačné vlastnosti. Tento prooxidačný účinok je dávkovo závislý a významný od pomeru 0,5:1; tj. koncentrácia tejto kyseliny 125  $\mu$ M.

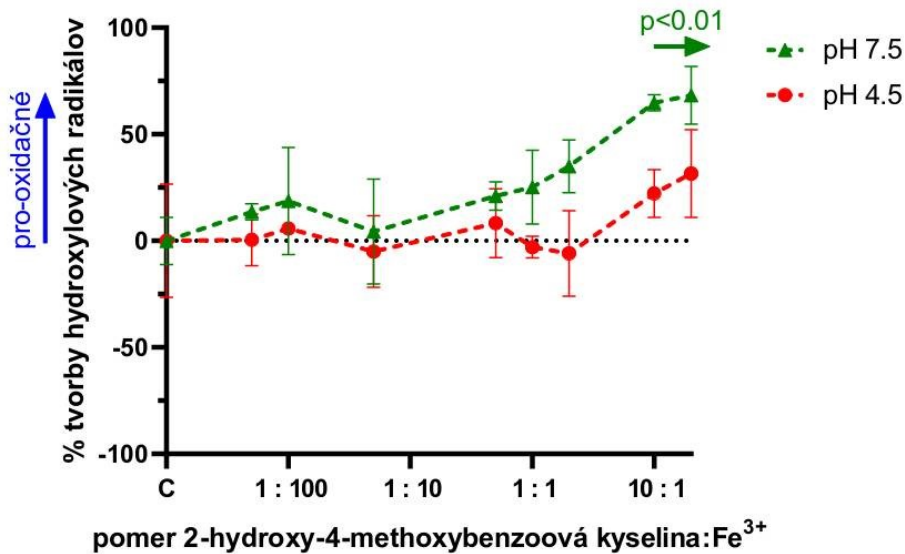


Obr. 16 Vplyv 2,4,6-trihydroxybenzoovej kyseliny na železom katalyzovanú Fentonovu reakciu. Finálna koncentrácia  $Fe^{3+}$  iónov bola vždy 5 mM (pomer 2,4,6-trihydroxybenzoovej kyseliny k  $Fe^{3+}$  20:1). Červená a zelená šípka označuje všetky body, ktoré boli štatisticky významné odlišné od pozitívnej kontroly (C), tj. vzorku, ktorý sa líšil iba absenciou testovanej látky, pri pH 4,5 a 7,5.

### 7.7. Vplyv kyseliny 2-hydroxy-4-methoxybenzoovej na železom katalyzovanú Fentonovu reakciu

Na obrázku 17 pozorujeme štatisticky významný nárast produkcie hydroxylových radikálov pri pH 7,5. Najvyššie hodnoty tvorby hydroxylových radikálov sú opäť pri vyšších koncentráciách, presnejšie pri 10:1 (2,5 mM 2-hydroxy-4-methoxybenzoová) a 20:1 (5 mM). Z toho môžeme usúdiť, že kyselina 2-hydroxy-4-methoxybenzoová má pri pH 7,5 výrazné prooxidačné vlastnosti.

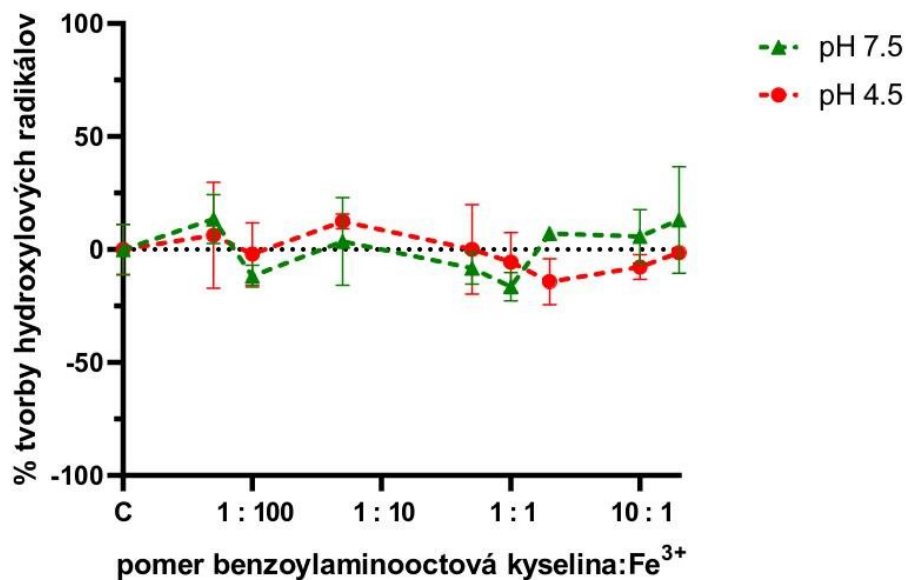
Pri pH 4,5 nepozorujeme žiadny štatisticky významný pokles alebo nárast tvorby hydroxylových radikálov. Veľkosť smerodatných odchýliek taktiež naznačuje určitú variabilitu v nameraných hodnotách.



Obr. 17 Vplyv 2-hydroxy-4-methoxybenzoovej kyseliny na železom katalyzovanú Fentonovu reakciu. Finálna koncentrácia  $Fe^{3+}$  iónov bola vždy 5 mM (pomer 2-hydroxy-4-methoxybenzoovej kyseliny k  $Fe^{3+}$  20:1). Zelená šípka označuje pomery 10:1 a 20:1, ktoré boli štatisticky významne odlišné od pozitívnej kontroly (C), tj. vzorku ktorý sa líšil iba absenciou testovanej látky, pri pH 7,5.

### 7.8. Vplyv kyseliny benzoylaminooctovej na železom katalyzovanú Fentonovu reakciu

Na grafe (obr. 18) vidíme, že kyselina benzoylaminooctová (kyselina hyppurová) nespôsobila štatisticky významný pokles alebo nárast v tvorbe hydroxylových radikálov. Môžeme teda zhodnotiť, že kyselina benzoylaminooctová nemá antioxidačné ani prooxidačné vlastnosti.



Obr. 18 Vplyv benzylaminooctovej kyseliny na železom katalyzovanú Fentonovu reakciu.

Finálna koncentrácia  $Fe^{3+}$  iónov bola vždy 5 mM (pomer benzylaminooctovej kyseliny k  $Fe^{3+}$  20:1). V žiadnom pomere nebol pozorovaný štatisticky významný rozdiel pri porovnaní s kontrolnou slepou vzorkou (C).



## 8. Diskusia

Flavonoidy sú prírodné fenolové zlúčeniny, ktoré radíme medzi sekundárne metabolity rastlín. Za pozoruhodné sú mimo iné považované ich antioxidantné vlastnosti, kedy v širokom spektre štúdií naznačovali možné využitie v terapii rôznych ochorení, kam spadá diabetes mellitus, srdcové ochorenia, karcinómy, rôzne typy infekcií a zápalových ochorení. Tieto ich účinky však boli vo väčšine dokázané v *in vitro* štúdiách alebo epidemiologických štúdiách, z čoho nám vyplýva, že o samotnom mechanizme účinku v organizme vieme len veľmi málo. Na druhej strane množstvo farmakokinetických štúdií zhodnotilo, že flavonoidy majú zlu biologickú dostupnosť po per orálnom príjme a podliehajú významnému metabolizmu v hrubom čreve za vzniku nízkomolekulárnych fenolových látok. (Feng et al. 2018; Najmanová et al. 2020)

S narastajúcimi vedomosťami o flavonoidnom metabolizme dochádza taktiež k lepšiemu pochopeniu ich metabolizmu. Bolo zistené, že niektoré produkty, ktoré vznikli degradačným vplyvom črevnej mikroflóry majú podobnú alebo potentnejšiu aktivitu ako materské flavonoidy. Naskytá sa tu teda možnosť, že škála účinkov, ktorá je dlhodobo pripisovaná flavonoidom je v skutočnosti efektom ich metabolitov. (Applová et al. 2019; Dias et al. 2022; Najmanová et al. 2016)

Antioxidantné vlastnosti sú kľúčové k udržaniu zdravia, nakoľko pri produkcii ROS/RNS dochádza k významnému poškodeniu organizmu a rozvoju chronických ochorení (metabolický syndróm, kardiovaskulárne ochorenia, diabetes mellitus a pod.), ale taktiež ku vzniku a následnej progresii proliferatívnych procesov. Antioxidantné látky sú schopné rôznymi mechanizmami znižovať hladiny ROS/RNS v organizme a tým preventovať vznik vyššie spomenutých ochorení. (Gantenbein a Gantenbein 2021)

V prípade zvýšenej koncentrácie antioxidantnej látky v organizme, prípadne výskytu patologických stavov môže ale dochádzať k opačnému javu, tj. prooxidácii, ktorá je taktiež riziková z hľadiska poškodenia organizmu. (Moř et al. 2014)

V našej práci sme sa sústredili práve na antioxidantné či prooxidantné vlastnosti benzoových derivátov metabolitov flavonoidov. Skúmali sme ich pomocou Fentonovej reakcie, ktorá je považovaná za biologický relevantnú.

Na základe našich výsledkov môžeme zhodnotiť, že na prejav antioxidantných eventuálne prooxidantných účinkov je nutný určitý stupeň hydroxylácie benzenového jadra,

z čoho vyplýva, že sa žiadne účinky neprejavili v prípade látok bez hydroxylovej skupiny (kyselina benzoová a kyselina benzoylaminoctová), izolovaný hydroxyl taktiež nebol dostatočný na prejav jedného z vyššie spomínaných účinkov. Antioxidačné vlastnosti boli preukázané až u dihydroxylových derivátov kyseliny benzoovej, navýšenie počtu hydroxyskupín však neprinieslo už ďalšie benefity z hľadiska antioxidačnej aktivity a trihydroxylové usporiadanie vykazovalo prooxidačné vlastnosti, podobne ako aj kyselina 2-hydroxy-4-methoxybenzoová.

V literatúre sa vyskytujú niektoré práce, ktoré skúmali interakciu týchto látok s železom alebo ROS. Príkladom relevantnej metodiky je tzv. FRAP (The ferric reducing antioxidant power) založený principiálne na redukcii bezfarebného komplexu  $Fe^{3+}$  s 2,4,6-tripyridyl-*S*-triazínom za vzniku intenzívne modro sfarbeného komplexu  $Fe^{2+}$  s 2,4,6-tripyridyl-*S*-triazínom v prítomnosti antioxidantu, tj. látky schopné redukovať železité ióny na železnaté. Spiegel et al. (2020) využili tento test na preskúmanie antioxidačných vlastností derivátov kyseliny benzoovej. Najsilnejšiu aktivitu nimi meraných benzoových derivátov vykazovali v tomto teste dihydroxylované deriváty kyseliny benzoovej. Najvýraznejšia aktivita bola zaznamenaná v prípade kyseliny 2,3-dihydroxybenzoovej, nasledovaná mierne nižšou mierou redukčných vlastností ďalších dihydroxylovaných derivátov (2,5-dihydroxybenzoová a 3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina). V tomto smere sa výsledky FRAP testu zhodujú s našimi výsledkami vplyvu dihydroxylovaných kyselín na Fentonovu reakciu. Je nutné však upozorniť, že redukcie železitých iónov na železnaté by skôr mala potencovať Fentonovu reakciu, pretože tým dochádza k obnove katalyzátora, tj. železnatých iónov. Limitáciou metodiky FRAP je taktiež fakt, že sa obvykle testuje iba jedna koncentrácia skúmanej látky a taktiež pri veľmi nízkom pH 3,6, ktoré nie je príliš fyziologické s výnimkou žalúdka. V prvom prípade je známe, že látky, ktoré chelatujú i redukujú ióny železa môžu dávať tzv. „znovú“ krivku, kedy nízke koncentrácie redukujú železité ióny, zatiaľ čo vysoké ich chelátujú. (Macáková et al. 2012) V princípe totiž silné chelátory nedávajú vo FRAP metodike pozitívne výsledky, pretože viažu ióny železa a neumožňujú tvorbu komplexu s 2,4,6-tripyridyl-*S*-triazínom. Za veľmi kyselých podmienok existuje ale málo prírodných látok či ich metabolitov, ktoré sú schopné silnej chelatacie. (Waseem et al. 2021) Navyše v danej štúdii vykázali podobnú antioxidačnú aktivitu ako dihydroxylované deriváty vykazovali aj benzoová kyseliny substituované tromi hydroxylovými skupinami. Nami testovaná kyselina 2,4,6-trihydroxybenzoová sa však chovala vo Fentonovej reakcii prooxidačne. Veľmi nízka antioxidačná účinnosť bola zaznamenaná FRAP testom v prípade benzoových kyselín s jednou hydroxyskupinou (3-hydroxybenzoová

kyselina, 4-hydroxybenzoová kyselina). To by taktiež zodpovedalo našim výsledkom, tj. že tieto látky neinteragujú s iónmi železa, tj. že nie sú schopné chelátovať ani redukovať. Výsledku tohto FRAP testu taktiež dokázali, že v porovnaní s nemetylovanými derivátmi, metylované nepreukázali výraznú antioxidačnú aktivitu. Znamená to, že metylácia hydroxylových skupín v molekule totiž vedie celkovo k poklesu aktívnych elektrónových a vodíkových donorov v molekule. Štúdia zaznamenala dva kľúčové faktory, ktoré ovplyvňujú redukčné vlastnosti molekuly, presnejšie ide o rezonančnú stabilizáciu, kedy hydroxylové skupina navzájom lokalizované v polohách *ortho* alebo *para* vykazovali najsilnejšiu aktivitu. Ďalším faktorom sú intramolekulárne vodíkové väzby.

Ďalšia štúdia, ktorá potvrdila mieru závislosti antioxidačnej aktivity od počtu hydroxylových skupín bola Nastella et al. (1999). Štúdia skúmala účinok derivátov kyseliny benzoovej a ich vplyv na oxidačnú modifikáciu LDL častíc na základe dvoch oxidačných systémov a to ovplyvnením med'ou katalyzovanej oxidácie alebo tepelného rozkladu 2,2'-azobis(2-amidinopropán) chloridu. V oboch prípadoch preukázali dihydroxy deriváty kyseliny benzoovej výraznejšiu aktivitu ako tomu bolo u molekúl s jednou hydroxylovou skupinou. Látky okrem schopnosti vychytávať peroxylové radikály preukázali aj schopnosť chelátovať ióny kovov. Táto štúdia je určite bližšia svojim charakterom nášmu výskumu, pretože je i biologicky výrazne viac relevantná než samotná metóda FRAP, ktorá je skôr prídavná vzhľadom k vyššie spomenutým limitáciám.

S prítomnosťou antioxidačných vlastností tu vždy existuje určité riziko prooxidácie. Yordi et al. (2015) vo svojej štúdie preukázala prostredníctvom klastrogenicity spôsobenej poškodením DNA prooxidačné vlastnosti benzoových kyselín. Za aktívne sú teda považované látky oplývajúce klastrogénnymi vlastnosťami schopné poškodiť DNA. Vo všeobecnosti štúdia zhodnotila, že deriváty s jednou eventuálne dvomi hydroxylovými substituentmi a bez esterifikácie nevykazujú klastrogénne vlastnosti resp. prooxidačnú aktivitu. Avšak molekuly obsahujúce tri hydroxylové skupiny vykazovali klastrogénne účinky na DNA skrz svoje prooxidačné vlastnosti. Podobne tomu bolo aj v prípade prítomnosti methoxyskupín v molekule, kedy navýšením počtu týchto skupín dochádzalo aj k vyššej klastrogénnej aktivite. Všeobecne vykazovala methoxyskupina v porovnaní s hydroxyskupinou vyššiu klastrogénnu aktivitu. Tento jav môže byť spôsobený v prípade methoxyskupiny prítomnosťou nezdieľaného elektrónového páru kyslíka, ktorý vytvorí dostupnejšie spojenie s elektrónovým oblakom benzénového jadra. Zaujímavým faktom je, že štúdia nepreukázala akýkoľvek vzťah medzi

touto aktivitou a polohou substituentov, podobne aktívne boli molekuly, ktorých tri substituenty boli izolované ale aj susediace.

Z hľadiska redukčných účinkov derivátov benzoovej kyseliny na železo bolo taktiež pozorované, že v prípade štruktúr podobných hydrochinónu (2 hydroxylové skupiny navzájom v polohe *para*) sú oveľa účinnejšie v redukcii  $\text{Fe}^{3+}$  ako tomu je u molekúl štruktúrne podobných katecholom (2 hydroxyskupiny navzájom v polohe *ortho*). Okrem tejto dôležitej informácie štúdia informuje o významnej produkcii  $\text{Fe}^{2+}$  všetkými derivátmi trihydroxybenzoovej kyseliny. (Nichela et al. 2015) Z týchto výsledkov možno súdiť, že látky s *ortho*-dihydroxyskupinou sú schopné taktiež chelátovať ióny železa, kdežto tie s *para* polohou ióny kovov nechelátujú, iba redukujú.

Limitáciou našej štúdie je čisto *in vitro* charakter a to i cez použitie Fentonovej reakcie, ktorá je považovaná za biologicky relevantnú. V reálnych podmienkach môžu byť účinky nami skúmaných lýtok ovplyvnené prítomnosťou iných anatioxidantov, napr. na konjugáty a v biologických vzorcoch boli skutočne detekované konjugáty benzoových kyselín. (Jokioja et al. 2021)

## 9. Záver

Hlavnými výstupmi tejto práce sú:

1. Kyselina benzoová, kyselina 3-hydroxybenzoová, kyselina 4-hydroxybenzoová, kyselina benzoylaminoctová nevykazovali v žiadnej testovanej koncentrácii antioxidantné ani prooxidantné vlastnosti.
2. Kyselina 2,4-dihydroxybenzoová od koncentračného pomeru 1:1 a kyselina 3,4-dihydroxybenzoová od koncentračného pomeru 2:1 vykazovali antioxidantné vlastnosti pri pH 7,5.
3. Kyselina 2,4,6-trihydroxybenzoová preukázala svoje prooxidantné vlastnosti pri pH 4,5 a 7,5 v pomere 20:1. Taktiež kyselina 2-hydroxy-4-methoxybenzoová mala prooxidantné vlastnosti, ktoré boli namerané pri pH 7,5 v pomere 10:1.
4. Vzhľadom k charakteru tejto štúdie je ale v prípade použitia týchto látok v klinickej praxi nutné overiť tieto účinky *in vivo* a to ako účinnosť, tak aj možnú toxicitu.

## 10. Použité skratky

ATP – adenzíntrifosfát

CoA – koenzým A

COX-1 – cyklooxygenáza-1

DMT-1 – transportér dvojmocných kovov, z ang. **d**ivalent **m**etal (ion) **t**ransporter 1

FRAP – ferric reducing antioxidant power

GSH – glutatión

GST – glutatión-S-transferáza

HPLC – vysoko účinná kvapalinová chromatografia, z angl. **h**igh-**p**erformance **l**iquid chromatography

IL – interleukín

LDL – lipoproteín o nízkej hustoty, z anglického **l**ow **d**ensity lipoprotein

NADPH – nikotínamidadenínindinukleotidfosfát

PPAR $\gamma$  – peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$

RNS – reaktívne formy dusíka z anglického **r**eactive **n**itrogen **s**pecies

ROS – reaktívne formy kyslíka z anglického **r**eactive **o**xygen **s**pecies

TAG – triacylglyceroly

TfR1 – transferín-receptor 1

## 11. Použitá literatura

Abenavoli L, Izzo AA, Milić N, Cicala C, Santini A, Capasso R. Milk thistle (*Silybum marianum*): A concise overview on its chemistry, pharmacological, and nutraceutical uses in liver diseases. *Phytother Res.* 2018;32(11):2202-2213.

Al-Aubaidy et al.. Twelve-Week Mediterranean Diet Intervention Increases Citrus Bioflavonoid Levels and Reduces Inflammation in People with Type 2 Diabetes Mellitus. *Nutrients.* 2021;13(4):1133.

American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2013;36 Suppl 1(Suppl 1):S67-74.

Ancion A, Tridetti J, Nguyen Trung ML, Oury C, Lancellotti P. A Review of the Role of Bradykinin and Nitric Oxide in the Cardioprotective Action of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors: Focus on Perindopril. *Cardiol Ther.* 2019;8(2):179-191.

Applová L et al. 4-Methylcatechol, a Flavonoid Metabolite with Potent Antiplatelet Effects. *Mol Nutr Food Res.* 2019;63(20):e1900261.

Beecher GR. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J Nutr.* 2003;133(10):3248S-3254S.

Carrasco-PozoC, Gotteland M, Castillo R L, Chen CH. 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid, a microbiota-derived metabolite of quercetin, protects against pancreatic  $\beta$ -cells dysfunction induced by high cholesterol. *Exp Cell Res.* 2015;334(2):270-82 .

Ciumărnean L et al. The Effects of Flavonoids in Cardiovascular Diseases. *Molecules.* 2020;25(18):4320.

Constantinescu T, Lungu CN. Anticancer Activity of Natural and Synthetic Chalcones. *Int J Mol Sci.* 2021;22(21):11306.

Curtis PJ et al. Vascular function and atherosclerosis progression after 1 y of flavonoid intake in statin-treated postmenopausal women with type 2 diabetes: a double-blind randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2013;97(5):936-42.

Dias MC, Pinto DCGA, Silva AMS. Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity. *Molecules.* 2021;26(17):5377.

Dias P, Pourová J, Vopršalová M, Nejmanová I, Mladěnka P. 3-Hydroxyphenylacetic Acid: A Blood Pressure-Reducing Flavonoid Metabolite. *Nutrients*. 2022;14(2):328.

Egert S et al. Quercetin reduces systolic blood pressure and plasma oxidised low-density lipoprotein concentrations in overweight subjects with a high-cardiovascular disease risk phenotype: a double-blinded, placebo-controlled cross-over study. *Br J Nutr*. 2009;102(7):1065-74.

Escobar-Cévoli R, Castro-Espín, Béraud V, Buckland G, Zamora-Ros R. An overview of Global Flavonoid Intake and its Food Sources. In: Justino GC., eds. *Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health*. London:IntechOpen, 2017:452-164

Ettehad D et al. Blood pressure lowering for prevention of cardiovascular disease and death: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2016;387(10022):957-967.

Feng X, Li Y, Brobbey Oppong M, Qiu F. Insights into the intestinal bacterial metabolism of flavonoids and the bioactivities of their microbe-derived ring cleavage metabolites. *Drug Metab Rev*. 2018;50(3):343-356.

Fernandes I, Pérez-Gregorio R, Soares S, Mateus N, de Freitas V. Wine Flavonoids in Health and Disease Prevention. *Molecules*. 2017;22(2):292.

Friggeri L et al. Design, synthesis and evaluation of 3,4-dihydroxybenzoic acid derivatives as antioxidants, bio-metal chelating agents and acetylcholinesterase inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2015;30(1):166-72.

Galaris D, Barbouti A, Pantopoulos K. Iron homeostasis and oxidative stress: An intimate relationship. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2019;1866(12):118535.

Galaris D, Pantopoulos K. Oxidative stress and iron homeostasis: mechanistic and health aspects. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2008;45(1):1-23.

Gantenbein KV, Kanaka-Gantenbein C. Mediterranean Diet as an Antioxidant: The Impact on Metabolic Health and Overall Wellbeing. *Nutrients*. 2021;13(6):1951.

Gao K et al. 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*. 2006;136(1):52-7.



Ghiasian M, Nafisi H, Ranjbar A, Mohammadi Y, Ataei S. Antioxidative effects of silymarin on the reduction of liver complications of fingolimod in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: A clinical trial study. *J Biochem Mol Toxicol.* 2021;35(8):e22800.

Graefe EU, Derendorf H, Veit M. Pharmacokinetics and bioavailability of the flavonol quercetin in humans. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 1999;37(5):219-33.

Guglielmi F, Luceri C, Giovannelli L, Dolara P, Lodovici M. Effect of 4-coumaric and 3,4-dihydroxybenzoic acid on oxidative DNA damage in rat colonic mucosa. *Br J Nutr.* 2003;89(5):581-7.

Henning SM et al. Phenolic acid concentrations in plasma and urine from men consuming green or black tea and potential chemopreventive properties for colon cancer. *Mol Nutr Food Res.* 2013;57(3):483-93.

Chifman J, Laubenbacher R, Torti SV. A systems biology approach to iron metabolism. *Adv Exp Med Biol.* 2014;844:201-25.

Choudhury R, Srail SK, Debnam E, Rice-Evans CA. Urinary excretion of hydroxycinnamates and flavonoids after oral and intravenous administration. *Free Radic Biol Med.* 1999;27(3-4):278-86.

Jaganath IB, Mullen W, Edwards CA, Crozier A. The relative contribution of the small and large intestine to the absorption and metabolism of rutin in man. *Free Radic Res.* 2006;40(10):1035-46.

Jokioja J, Percival J, Philo M, Yang B, Kroon PA, Linderborg KM. Phenolic Metabolites in the Urine and Plasma of Healthy Men After Acute Intake of Purple Potato Extract Rich in Methoxysubstituted Monoacylated Anthocyanins. *Mol Nutr Food Res.* 2021;65(9):e2000898.

Karličková J, Říha M, Filipický T, Macáková K, Hrdina R, Mladěnka P. Antiplatelet Effects of Flavonoids Mediated by Inhibition of Arachidonic Acid Based Pathway. *Planta Med.* 2016;82(1-2):76-83.

Kaushal N, Singh M, Singh Sangwan R. Flavonoids: Food associations, therapeutic mechanisms, metabolism and nanoformulations. *Food Res Int.* 2022;157:111442.

Kim DH, Jung EA, Sohng IS, Han JA, Kim TH, Han MJ. Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities. *Arch Pharm Res.* 1998;21(1):17-23.

Kopustinskiene DM, Jakstas V, Savickas A, Bernatoniene J. Flavonoids as Anticancer Agents. *Nutrients*. 2020;12(2):457.

Larson AJ, Symons JD, Jalili T. Therapeutic potential of quercetin to decrease blood pressure: review of efficacy and mechanisms. *Adv Nutr*. 2012;3(1):39-46.

Liu J, Du C, Beaman HT, Monroe MBB. Characterization of Phenolic Acid Antimicrobial and Antioxidant Structure-Property Relationships. *Pharmaceutics*. 2020;12(5):419.

Macáková K et al. Iron reduction potentiates hydroxyl radical formation only in flavonols. *Food Chem*. 2012;135(4):2584-92.

Masella R et al. Antioxidant activity of 3,4-DHPEA-EA and protocatechuic acid: a comparative assessment with other olive oil biophenols. *Redox Rep*. 1999;4(3):113-21

Mattioli R, Francioso A, Mosca L, Silva P. Anthocyanins: A Comprehensive Review of Their Chemical Properties and Health Effects on Cardiovascular and Neurodegenerative Diseases. *Molecules*. 2020;25(17):3809.

Mladenka P, Hrdina R, Hübl M, Simůnek T. The fate of iron in the organism and its regulatory pathways. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2005;48(3-4):127-35.

Mladenka P, Zatloukalová L, Filipický T, Hrdina R. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radic Biol Med*. 2010;49(6):963-75.

Monagas M et al. Dihydroxylated phenolic acids derived from microbial metabolism reduce lipopolysaccharide-stimulated cytokine secretion by human peripheral blood mononuclear cells. *Br J Nutr*. 2009;102(2):201-6.

Moş AC, Coman C, Miron C, Damian G, Sarbu C, Silaghi-Dumitrescu R. An assay for pro-oxidant reactivity based on phenoxyl radicals generated by laccase. *Food Chem*. 2014;143:214-22.

Murota K, Nakamura Y, Uehara M. Flavonoid metabolism: the interaction of metabolites and gut microbiota. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2018;82(4):600-610.

Najmanová I et al. Flavonoid metabolite 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid formed by human microflora decreases arterial blood pressure in rats. *Mol Nutr Food Res*. 2016;60(5):981-91.

Najmanová I, Pourová J, Mladěnka P. A Mixture of Phenolic Metabolites of Quercetin Can Decrease Elevated Blood Pressure of Spontaneously Hypertensive Rats Even in Low Doses. *Nutrients*. 2020;12(1):213.

Natella F, Nardini M, Di Felice M, Scaccini C. Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: structure-activity relation. *J Agric Food Chem*. 1999;47(4):1453-9.

Navarro VJ et al. Silymarin in NASH and C Hepatitis (SyNCH) Study Group. Silymarin in non-cirrhotics with non-alcoholic steatohepatitis: A randomized, double-blind, placebo controlled trial. *PLoS One*. 2019;14(9):e0221683.

Nichela D A et al. Iron cycling during the autocatalytic decomposition of benzoic acid derivatives by Fenton-like and photo-Fenton techniques. *Appl Catal B*. 2015;170-171, 312-321.

Niu TT et al. Protective Effects of Ginkgolide on a Cellular Model of Alzheimer's Disease via Suppression of the NF- $\kappa$ B Signaling Pathway. *Appl Biochem Biotechnol*. 2022;194(6):2448-2464.

North BJ, Sinclair DA. The intersection between aging and cardiovascular disease. *Circ Res*. 2012;110(8):1097-108.

Odai T, Terauchi M, Kato K, Hirose A, Miyasaka N. Effects of Grape Seed Proanthocyanidin Extract on Vascular Endothelial Function in Participants with Prehypertension: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *Nutrients*. 2019;11(12):2844.

Olthof MR, Hollman PC, Buijsman MN, van Amelsvoort JM, Katan MB. Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. *J Nutr*. 2003;133(6):1806-14.

Oney-Montalvo JE, Avilés-Betanzos KA, Ramírez-Rivera EJ, Ramírez-Sucre MO, Rodríguez-Buenfil IM. Polyphenols Content in *Capsicum chinense* Fruits at Different Harvest Times and Their Correlation with the Antioxidant Activity. *Plants (Basel)*. 2020;9(10):1394.

Pang B et al. Prediction of new targets and mechanisms for quercetin in the treatment of pancreatic cancer, colon cancer, and rectal cancer. *Food Funct*. 2019;10(9):5339-5349.

Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci*. 2016;29;5:e47.

Perez A et al. The flavonoid quercetin induces acute vasodilator effects in healthy volunteers: correlation with beta-glucuronidase activity. *Pharmacol Res*. 2014;89:11-8.

Petric T, Kiferle C, Perata P, Gonzali S. Optimizing shelf life conditions for anthocyanin-rich tomatoes. PLoS One. 2018;13(10):e0205650.

Pourová J et al. Two flavonoid metabolites, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and 4-methylcatechol, relax arteries ex vivo and decrease blood pressure *in vivo*. Vascul Pharmacol. 2018;111:36-43.

Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. Fitoterapia. 2011;82(4):513-23.

Róžańska D, Regulska-Ilow B. The significance of anthocyanins in the prevention and treatment of type 2 diabetes. Adv Clin Exp Med. 2018;27(1):135-142.

Říhová H. Flavonoidy. Stručný přehled a biologický význam. Diplomová práce. Karlova univerzita, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, 2008:10,13 s.

Saeed A, Kampangkaew J, Nambi V. Prevention of Cardiovascular Disease in Women. Methodist Deakey Cardiovasc J. 2017;13(4):185-192.

Safaeian L, Emami R, Hajhashemi V, Haghghatian Z. Antihypertensive and antioxidant effects of protocatechuic acid in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. Biomed Pharmacother. 2018 ;100:147-155.

Sahu S C, Gray G C. Pro-oxidant activity of flavonoids: effects on glutathione and glutathione S-transferase in isolated rat liver nuclei. Cancer Lett. 1996;104(2):193-6.

Salehi B et al. The Therapeutic Potential of Apigenin. Int J Mol Sci. 2019;20(6):1305.

Semaming Y, Pannengpetch P, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. Pharmacological properties of protocatechuic Acid and its potential roles as complementary medicine. Evid Based Complement Alternat Med. 2015;2015:593902.

Sharma A, Shahzad B, Rehman A, Bhardwaj R, Landi M, Zheng B. Response of Phenylpropanoid Pathway and the Role of Polyphenols in Plants under Abiotic Stress. Molecules. 2019;24(13):2452.

Shen N, Wang T, Gan Q, Liu S, Wang L, Jin B. Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. Food Chem. 2022;383:132531.

Skálová L, Boušová I a kolektiv. Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik. Vyd. 1. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2013; 80-87.

Spiegel M. et al. Antioxidant Activity of Selected Phenolic Acids-Ferric Reducing Antioxidant Power Assay and QSAR Analysis of the Structural Features. *Molecules*. 2020;25(13):3088.

Su J et al. Luteolin Ameliorates Hypertensive Vascular Remodeling through Inhibiting the Proliferation and Migration of Vascular Smooth Muscle Cells. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015;2015:364876.

Sun Y, Ji X, Cui J, Mi Y, Zhang J, Guo Z. Synthesis, Characterization, and the Antioxidant Activity of Phenolic Acid Chitoooligosaccharide Derivatives. *Mar Drugs*. 2022;20(8):489.

Trojan S. *Lékařská fyziologie*. Vyd. 4. Praha: Grada ; 2003: 201, 368 .

Ullah A et al. Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent. *Molecules*. 2020;25(22):5243.

Valentová K et al. Biosafety and antioxidant effects of a beverage containing silymarin and arginine. A pilot, human intervention cross-over trial. *Food Chem Toxicol*. 2013;56:178-83.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*. 2006;160(1):1-40.

Veronika Protivová. Flavonoidy a jejich role ve vývoji rostlin. *Bakalárska práca*. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno, 2006: 7 s.

Waseem N et al. Natural Iron Chelators as Potential Therapeutic Agents for Treatment of Iron Overload Diseases. *Trace Elements and Their Effects on Human Health and Diseases* (Ed. Joseph D). E-book 2021. <http://www.intechopen.com/chapters/77500>

Williamson G, Clifford MN. Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity? *Br J Nutr*. 2010;104 Suppl 3:S48-66.

Yang J, Qian D, Jiang S, Shang EX, Guo J, Duan JA. Identification of rutin deglycosylated metabolites produced by human intestinal bacteria using UPLC-Q-TOF/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2012;898:95-100.

Yao W, Zhang X, Xu F, Cao C, Liu T, Xue Y. The therapeutic effects of naringenin on bronchial pneumonia in children. *Pharmacol Res Perspect*. 2021;9(4):e00825.

Yordi E G, Matos M J, Pupo R C, Santana L, Uriarte E, a Pérez E M. In silico clastogenic activity of dietary phenolic acids. *Food Sci Technol*. 2015;61(1), 216-223.

Zhang J et al. Structurally Different Flavonoid Subclasses Attenuate High-Fat and High-Fructose Diet Induced Metabolic Syndrome in Rats. *J Agric Food Chem.* 2018;66(46):12412-12420.