

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



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vliv malých fenolických metabolitů flavonoidů
(propionových kyselin) na železem katalyzovanou
Fentonovu reakci

Vedoucí diplomové práce:

PharmDr. Zuzana Lomozová, Ph.D.

Hradec Králové, 2024

Sára Spiller

CHARLES UNIVERSITY

FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRÁLOVÉ

DEPARTMENT OF PHARMACOGNOSIS AND PHARMACEUTICAL BOTANY



DIPLOMA THESIS

The impact of small phenolic metabolites of
flavonoids (propionic acids) on the iron-catalysed
Fenton reaction

Supervisor:

PharmDr. Zuzana Lomozová, Ph.D.

Hradec Králové, 2024

Sára Spiller

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

V Hradci Králové, dne 10. 5. 2024

Sára Spiller

PODĚKOVÁNÍ

Velmi ráda bych poděkovala vedoucí mé diplomové práce PharmDr. Zuzaně Lomozové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, vstřícnost, přátelský přístup a pomoc při vypracování této diplomové práce. Za pomoc při experimentálním měření bych chtěla dále poděkovat Mahe Wehbe, která se mnou strávila část testování v laboratoři.

Rovněž bych ráda poděkovala své rodině a manželovi za jejich podporu a udržování mentálního zdraví v průběhu celého studia.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakognozie a farmaceutické botaniky

Kandidát: Sára Spiller

Školitel: PharmDr. Zuzana Lomozová, Ph.D.

Název diplomové práce: Vliv malých fenolických metabolitů flavonoidů (propionových kyselin) na železem katalyzovanou Fentonovu reakci

Klíčová slova: železo, flavonoid, Fentonova reakce, antioxidant, pro-oxidant

Železo je esenciální prvek, nezbytný pro správné fungování lidského organismu. Zapojuje se do mnoha buněčných procesů, kde působí jako kofaktor. Je fyziologicky velmi důležitý, zejména pro svou schopnost snadno přijímat a odevzdávat elektrony. Jeho množství v těle je přísně regulováno, protože v nadbytku volného kovu, by mohlo docházet k škodlivým radikálovým reakcím a rozvoji oxidačního stresu. Oxidační stres je zodpovědný za mnohé patologické procesy.

Flavonoidy jsou přírodní polyfenolické látky, které jsou obsaženy v řadě rostlin. Jejich konzumace je spojována s příznivými účinky na lidské zdraví, mezi které patří antioxidantní, protizánětlivé a kardioprotektivní vlastnosti. Navzdory jejich prospěšnému účinku, mohou za určitých okolností projevovat účinky pro-oxidační, související s jejich redoxními vlastnostmi. Během metabolismu flavonoidů dochází vlivem střevního mikrobiomu k jejich degradaci na jednoduché fenolické kyseliny, mezi které řadíme i propionové kyseliny.

V rámci této diplomové práce byly testované propionové kyseliny vystaveny železem katalyzované Fentonově reakci, která produkuje hydroxylové radikály. Byl zkoumán jejich vliv na snížení, popřípadě zvýšení produkce volných radikálů ve dvou hodnotách pH (4,5 a 7,5) pomocí HPLC přístroje. Kyselina 3-(3-hydroxyfenyl)propionová a kyselina 3-(2,4-dihydroxyfenyl)propionová projevily antioxidantní vlastnosti. Opačný výsledek prokázala kyselina 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová, která se jevila jako pro-oxidační.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany

Candidate: Sára Spiller

Supervisor: PharmDr. Zuzana Lomozová, Ph.D.

Title of diploma thesis: The impact of small phenolic metabolites of flavonoids (propionic acids) on the iron-catalysed Fenton reaction

Keywords: iron, flavonoid, Fenton reaction, antioxidant, pro-oxidant

Iron is an essential element, necessary for the proper functioning of the human body. It is involved in many cellular processes where it acts as a cofactor. It is physiologically very important, especially for its ability to readily accept and deliver electrons. Its amount in the body is strictly regulated because in excess of the free metal, harmful radical reactions and the development of oxidative stress could result. Oxidative stress is responsible for many pathological processes.

Flavonoids are natural polyphenolic substances that are found in many plants. Their consumption is associated with beneficial effects on human health, including antioxidant, anti-inflammatory, and cardioprotective properties. Despite their beneficial effects, they may, under certain circumstances, possess pro-oxidant effects related to their redox properties. During the metabolism of flavonoids, the gut microbiome degrades them to simple phenolic acids, including propionic acids.

In this thesis, the tested propionic acids were exposed to the iron-catalyzed Fenton reaction, which produces hydroxyl radicals. Their effect on reducing or increasing the production of free radicals was investigated at two pH values (4.5 and 7.5) using an HPLC instrument. 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid and 3-(2,4-dihydroxyphenyl)propionic acid showed antioxidant properties. The opposite result was shown by 3-(3,4-dihydroxyphenyl)propionic acid, which appeared to be pro-oxidant.

OBSAH

1. ÚVOD	9
2. CÍL PRÁCE	10
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	11
3.1 Železo jako prvek	11
3.2 Železo v lidském organismu	11
3.2.1 Fyziologie železa	11
3.2.2 Železo v potravě a jeho absorpce.....	13
3.2.3 Transport a ukládání železa.....	14
3.2.4 Patologie železa.....	15
3.3 Oxidační stres a Fentonova reakce.....	16
3.3.1 Chelatace železa	18
3.4 Flavonoidy	19
3.4.1 Charakteristika	19
3.4.2 Chemická struktura	20
3.4.3 Podskupiny flavonoidů	21
3.4.4 Biosyntéza flavonoidů	26
3.4.5 Biodostupnost a metabolismus flavonoidů.....	29
3.4.6 Antioxidační a pro-oxidační působení flavonoidů	32
3.5 Testované látky.....	34
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	39
4.1 Použitý materiál a pomůcky.....	39
4.1.1 Chemikálie.....	39
4.1.2 Přístroje.....	40
4.1.3 Pomůcky	40
4.2 Metodický postup.....	41
4.2.1 Příprava zásobních roztoků	41
4.2.2 Příprava pracovních roztoků	41
4.2.3 Příprava mobilní fáze.....	42
4.2.4 Provedení experimentu.....	42
4.3 Matematické a statistické vyhodnocení.....	44
5. VÝSLEDKY	45
5.1 Vliv testovaných látek na železem katalyzovanou Fentonovu reakci.....	46
5.1.1 Vliv 3-fenylpropionové kyseliny	46

5.1.2	Vliv 3-(3-hydroxyfenyl)propionové kyseliny	46
5.1.3	Vliv 3-(4-hydroxyfenyl)propionové kyseliny	47
5.1.4	Vliv 3-(2,4-dihydroxyfenyl)propionové kyseliny	48
5.1.5	Vliv 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionové kyseliny	48
5.1.6	Vliv 3-(3,5-dihydroxyfenyl)propionové kyseliny	49
5.1.7	Vliv 3-(3-hydroxyfenyl)-3-hydroxypropionové kyseliny	50
5.1.8	Vliv 3-kumarové kyseliny	50
6.	DISKUZE.....	52
7.	ZÁVĚR.....	56
8.	SEZNAM ZKRATEK.....	57
9.	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	59
10.	POUŽITÁ LITERATURA	61

1. ÚVOD

Železo je esenciální prvek pro správné fungování lidského těla. Díky své schopnosti snadno přijímat a odevzdávat elektrony se zapojuje do řady fyziologických procesů. Za normálních okolností je většina železa v těle vázána. Při narušení rovnováhy může dojít ke vzniku radikálových reakcí, jako je Fentonova reakce, kterých se železo účastní jako jejich katalyzátor. V důsledku toho vznikají reaktivní formy kyslíku, které se podílí na patologických stavech. Nadbytek volných radikálů vede ke vzniku oxidačního stresu, který je spojený s poškozením tkání a procesem stárnutí. Homeostáza železa je proto přísně regulována, aby nedocházelo k nadprodukci volných radikálů, rozvoji oxidačního stresu a dalších onemocnění.

Flavonoidy jsou sekundární metabolity rostlin, které jsou široce rozšířené. Strukturně je řadíme mezi polyfenolické látky a jejich konzumace je spojována s řadou zdravích příznivých účinků. Jsou hojně obsaženy v potravinách rostlinného původu, jako je ovoce, zelenina, čaj, káva a červené víno. Podle epidemiologických studií vykazují antioxidační a protizánětlivé účinky a mají pozitivní vliv na kardiovaskulární systém a prevenci neurodegenerativních onemocnění. Jejich antioxidační aktivita je spojována s jejich schopností vylučovat volné radikály nebo chelatovat nadměrné množství volných přechodných kovů. Za určitých podmínek však mohou mít i nežádoucí pro-oxidační účinky, které vedou ke zvýšení množství volných radikálů a rozvoji oxidačního stresu.

Po příjmu flavonoidů ve stravě jsou v lidském organismu masivně metabolizovány ještě před vstupem do systémového oběhu a jejich plazmatické koncentrace jsou nižší než 1 μM . Při jejich metabolismu jsou rozkládány bakteriemi tlustého střeva na jednoduché fenolické kyseliny. Mezi tyto metabolity patří i propionové kyseliny, které byly zkoumané v této práci. Ty se principiálně lépe absorbují a dosahují obecně vyšších koncentrací v plazmě než parentní flavonoidy.

2. CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo stanovit antioxidační nebo pro-oxidační účinky vybraných malých fenolických metabolitů flavonoidů, derivátů kyseliny propionové, které vznikají v tlustém střevě působením bakteriální mikroflóry. Dílčími cíly práce bylo zjistit, jak působí vybrané testované látky na produkci hydroxylových radikálů z železitými ionty indukované Fentonovy reakce za pato/fyziologických podmínek a následné určení vztahu mezi strukturou fenolických metabolitů a jejich aktivitou. Analýza indukce nebo inhibice vzniku volných hydroxylových radikálů byla provedena za použití *in vitro* HPLC metody při pH 7,5, které je blízké fyziologickému pH a také při pH 4,5, které napodobuje pH podmínky v žaludku, lysozomech nebo při výrazné acidóze.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Železo jako prvek

Železo je pevný kov šedé barvy, který je známý již od pravěku. Jeho chemický symbol Fe je odvozený z latinského slova *ferrum*, znamenající pevnost. V periodické soustavě prvků patří do 8. skupiny, 4. periody a řadí se tak mezi přechodné kovy. Jeho atomové číslo je 26 [1].

Jedná se o druhý nejrozšířenější kov na Zemi, nicméně v čisté podobě ho téměř nenajdeme. V přírodě se vyskytuje spolu s dalšími prvky ve formě železných rud. Jako příklady si můžeme uvést hematit, magnetit, siderit a takonit. Železo je nejstabilnější v oxidačním stavu +2 a +3, proto tvoří hlavně sloučeniny ve formě oxidů, síranů, chloridů nebo sulfidů. Mimo zemského jádra se také nachází ve hvězdách, Slunci, meteoritech a na povrchu Marsu [1, 2].

Mezi vlastnosti železa patří pevnost, tažnost, kujnost, schopnost vést elektrický proud a teplo a feromagnetismus. Elementární železo je chemicky reaktivní a v přítomnosti vzdušné vlhkosti koroduje. Takovou reakcí vznikají oxidy železité (Fe_2O_3) a železato-železité (Fe_3O_4), které se dají souhrnně označit jako rez. Jedná se tedy o oxidaci, což je nevratný proces [1, 2].

3.2 Železo v lidském organismu

3.2.1 Fyziologie železa

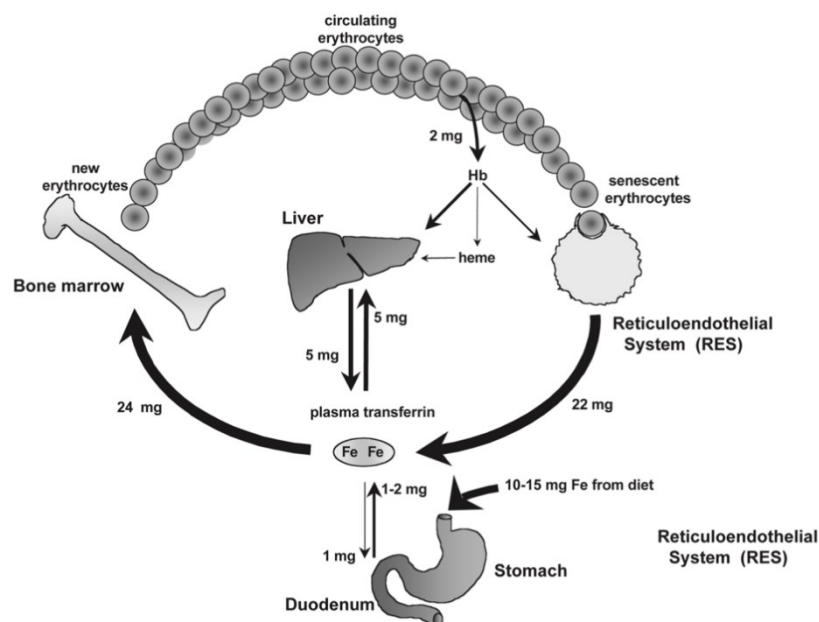
Železo je esenciální prvek pro většinu živých organismů. V těle zastává několik funkcí a účastní se různých metabolických procesů. Plní klíčovou úlohu v mnoha buněčných procesech jako je syntéza DNA, RNA a proteinů, regulace genové exprese, proliferace a diferenciací buněk, přenos elektronů a buněčné dýchání [3]. Na těchto činnostech se železo nepodílí přímo, ale funguje jako kofaktor pro syntézu hemoproteinů a nehemových proteinů obsahujících železo. Mezi hemoproteiny řadíme hemoglobin a myoglobin, což jsou bílkoviny, které váží a přenášejí kyslík po těle [4].

Lidské tělo obsahuje přibližně 3500 až 4000 mg železa. Z tohoto množství tvoří okolo 65 % již zmiňovaný hemoglobin, který se nachází v erytrocytech. Myoglobin,

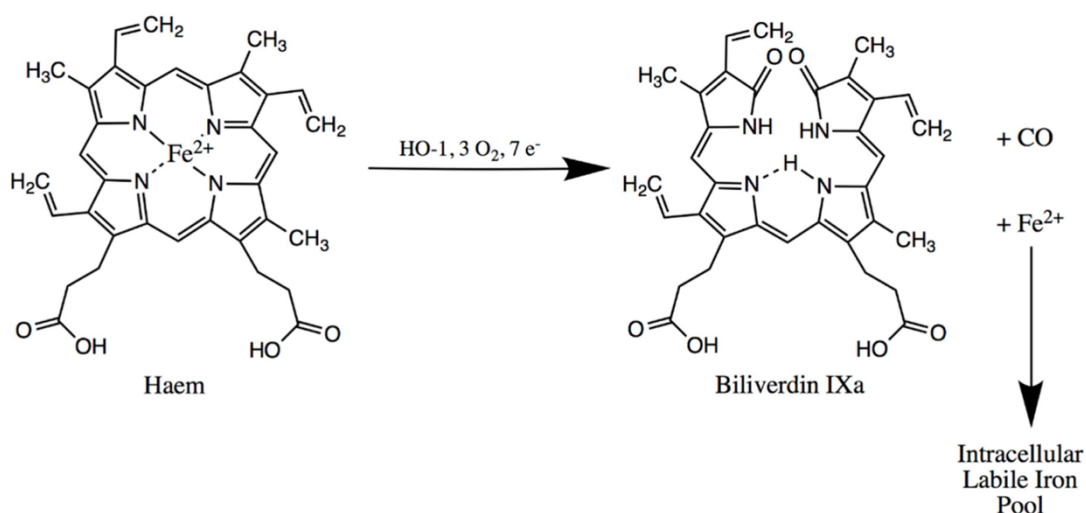
přítomný ve svalové tkáni, cytochromy a enzymy obsahují dalších 10 %. Zbývajících 25 % je ve formě snadno mobilizovatelných zásob železa. Tuto zásobní funkci mají na starosti proteiny ferritin a hemosiderin, ukládající se v hepatocytech a retikuloendotelových makrofázích [3–5].

Železo nemá žádný aktivní exkreční mechanismus. Ven z těla se vylučuje pouze deskvamací kůže a enterocytů nebo případným krvácením. Denní ztráty železa se pohybují okolo 1–2 mg, srovnatelné množství proto musí být přijímáno z potravy. U menstrujících nebo těhotných žen a u dětí je jeho potřeba vyšší [4, 6]. Na první pohled se může zdát, že tyto čísla nekorespondují s množstvím železa, které tělo využívá. Už jen na tvorbu nových erytrocytů v kostní dřeni je denně spotřebováno 24 mg. Toto zdánlivě chybějící množství je pokryto skrze recyklaci železa [7].

Role retikuloendotelového systému (RES) spočívá v imunologické obraně organismu, ale mimo to se podílí také na odstraňování poškozených a zanikajících buněk. Právě odstraňování stárnoucích erytrocytů vede k opětovnému uvolnění železa a jeho následné recyklaci. Takto se buňky RES (především sleziny, jater a kostní dřene) přímo podílí na metabolismu železa. Červená krvinka je hydrolytickými enzymy rozkládána a při štěpení hemoglobinu se uvolňuje hem, který je dále přeměněn pomocí hemoxygenázy na biliverdin, oxid uhelnatý a Fe^{2+} (železnatý iont). Takto uvolněné železo se buď uloží nebo znovu použije [7].



Obr. 1: Recyklace železa buňkami retikuloendotelového systému [7].



Obr. 2: Přeměna hemu na biliverdin, oxid uhelnatý a železnaté ionty [4].

3.2.2 Železo v potravě a jeho absorpce

Ve stravě se železo vyskytuje ve dvou formách – hemové a nehemové. Hemové železo je převážně získáváno z masa a lépe se vstřebává. Zejména červené maso s vysokým obsahem hemoglobinu je bohaté na obsah železa. Zdrojem nehemového železa jsou naopak rostlinné produkty, jako například obiloviny, luštěniny, ovoce a zelenina. Z celkového denního příjmu železa z potravy, který činí asi 15–20 mg, se vstřebává pouze jedna desetina. Míra absorpce nehemové formy železa je nižší a je více ovlivněná ostatními složkami potravy. Přestože nehemové železo má menší biologickou dostupnost, podílí se na výživě více, a to v důsledku jeho mnohonásobně vyššího množství ve stravě. Absorpce železa probíhá převážně v duodenu a z části v jejunu tenkého střeva. Po průchodu střevní stěnou do krve je železo dále transportováno [4, 5, 8].

Vstřebané množství závisí na typu železa i na podmínkách. Železo se tedy vyskytuje buď vázané v hemu s lepší biodostupností nebo ve formě železitých iontů (Fe³⁺) navázané na nějakou strukturu. Tyto železité ionty musí být nejprve redukovány na ionty železnaté, a to z důvodu rozpustnosti. V těle tuto přeměnu zajišťuje kyselé prostředí v žaludku. Nízké pH v důsledku produkce kyseliny chlorovodíkové zvyšuje rozpustnost železa, a tedy podporuje jeho vstřebávání. Také některé dietní faktory mohou ovlivnit absorpci. Kyselina askorbová je známá svou schopností zvyšovat

vstřebávání železa. Působí několika mechanismy, jednak svými redoxními vlastnostmi pomáhá redukovat Fe^{3+} na Fe^{2+} , zároveň působí jako chelátor kovů a dále reaguje s látkami, které absorpci snižují. Mezi další enhancery absorpce patří citrát a některé aminokyseliny. Fytát a polyfenoly z rostlinné stravy stejně tak jako živočišné bílkoviny (např. kasein, albumin nebo vaječný bílek) jsou naopak složky potravy, které mohou absorpci zhoršovat. Některé léky jako jsou např. inhibitory protonové pumpy nebo patologické stavy, které snižují produkci kyseliny chlorovodíkové mají také negativní vliv na absorpci [5, 9, 10].

Po konverzi jsou rozpustné železnaté ionty vstřebány pomocí transportéru 1 pro dvojmocné kovy (DMT1). DMT1 se nachází na apikální membráně enterocytů a slouží jako přenašeč také pro Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} a Pb^{2+} . Tyto kovy pak ve střevě soutěží s ionty železa a mohou ovlivňovat jeho biodostupnost. Při nedostatku železa se zvyšuje exprese DMT1 a v případě jeho genetické mutace dochází k vrozené anémii [9].

Systémovou regulaci absorpce železa má na starosti látka s názvem hepcidin (HEPC). Jedná se o peptidový hormon, který se skládá z 25 aminokyselin a jak napovídá jeho název, je produkován v játrech [9]. Jeho funkcí je snižování plazmatických koncentrací železa. HEPC blokuje absorpci a uvolňování zásob. Účinkuje skrze ferroportin (FPN), což je protein exprimovaný na povrchu buněk, které ukládají železo. HEPC se na FPN váže, degraduje ho a inhibuje tak uvolnění železa z těchto buněk. Koncentrace HEPC odráží potřebu železa v těle. Zvýšená erythropoéza (např. při hypoxii) a nedostatek železa vede ke snížení exprese HEPC, a tedy ke zvýšení absorpce. Naopak při nadměrných zásobách, infekci nebo zánětu jeho produkce roste [10, 11].

3.2.3 Transport a ukládání železa

Transferrin (Tf) hraje klíčovou úlohu ve vazbě a transportu železa krevním řečištěm. Je to polypeptidový řetězec, který je syntetizován převážně v játrech, ale i v mozku, varlatech a některých tkáních plodu. Ve své struktuře obsahuje dvě vazebné domény. Na tyto domény se může vázat řada kovů (železo, hliník, mangan, měď, kadmium). Železo má však nejvyšší afinitu a případné jiné kovy z jejich vazby vytěsňuje. Hlavní funkcí Tf je přijímat železo z plazmy a přenášet ho do různých tkání [3]. Většina železa v krvi je na něj vázaná a tento komplex může přestupovat do buněk skrze transferrinový

receptor (TfR) pomocí endocytózy. Následně se železo z Tf uvolňuje v důsledku nízkého pH v endozomu. TfR1 je exprimován všemi buňkami vyžadujícími železo [12]. Existuje i TfR2, který je však exprimován významně méně a pravděpodobně nehraje roli v příjmu železa [9].

Ferritin je protein, který slouží jako zásobárna železa. Skládá se ze dvou podjednotek (lehkého a těžkého řetězce), které tvoří dutinu, v níž může být uloženo až 4500 atomů železa. Uvnitř bílkovinného obalu dochází k oxidaci Fe^{2+} na Fe^{3+} a železo se ukládá v nerozpustné formě jako součást rostoucího krystalu ferrihydritu. V případě potřeby je železo z ferritinu uvolněno opětovnou redukcí. Syntéza ferritinu, podobně jako HEPC odráží potřeby organismu. Ferritin se nachází zejména v kostní dřeni a buňkách RES [3, 9].

Druhá sloučenina, která se podílí na ukládání buněčného železa nese název hemosiderin. Jedná se o nerozpustnou částici, která pravděpodobně vzniká degradací ferritinu. Kromě železa obsahuje i proteiny, sacharidy a lipidy. Zdá se, že při rostoucím přebytku železa v organismu dosahuje koncentrace ferritinu určitého maxima a větší část se ukládá právě v hemosiderinu. Oba zásobní proteiny mají ochrannou funkci, protože udržují kov ve vázané formě [9, 13].

3.2.4 Patologie železa

Železo je pro svou schopnost snadno přijímat a odevzdávat elektrony fyziologicky velmi významné. Za normálních podmínek je většina železa v těle vázaná. Problém nastává při zvýšení koncentrace volného železa, které je pro tělo toxické. Jeho nadbytek může vést k poškození tkání v důsledku produkce volných radikálů. Železo hraje klíčovou roli při vzniku oxidačního stresu, neboť působí jako katalyzátor radikálových reakcí. Oxidační stres následně vyvolává vznik patologických procesů, a proto musí být hladina železa v těle přísně regulována [4, 13, 14].

Díky regulaci metabolismu železa jsou jeho plazmatické koncentrace udržovány ve fyziologických hladinách. Při zánětlivých stavech nebo chronickém oxidačním stresu se může modulovat příjem a ukládání železa a narušovat tak jeho homeostázu. Přetížení organismu železem může být buď primární, které je způsobené dysregulací střevní absorpce nebo sekundární, které vzniká z jiné příčiny. Příkladem primárního přetížení

železem je hereditární hemochromatóza. Toto onemocnění je dědičné a souvisí s nadměrnou absorpcí železa z trávicího traktu a jeho následnou akumulací v životně důležitých orgánech [5, 13, 14].

Dysregulace homeostázy železa může vést i k dalším onemocněním. Narušený metabolismus železa zasahuje do metabolismu glukózy a může takto přispívat ke vzniku diabetu mellitu 2. typu, zároveň se železo podílí na vzniku nealkoholické steatohepatitidy, která souvisí s inzulinovou rezistencí. Se zvýšenou hladinou železa je spojená i ateroskleróza a s ní zvýšené riziko kardiovaskulárních onemocnění a infarktu myokardu. Ateroskleróza je zánětlivé onemocnění cévní stěny, doprovázené tvorbou tzv. aterosklerotických plátů, které ucpávají a zužují vnitřní průměr tepen. Přičemž na jejich tvorbu má vliv oxidace lipidů a proteinů způsobená železem. Přechodné kovy hrají také určitou roli v rozvoji neurodegenerativních onemocnění, jako je Alzheimerova nebo Parkinsonova choroba [13, 14].

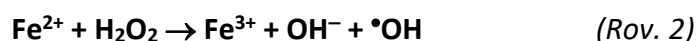
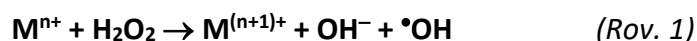
Na druhou stranu se může vyskytovat i nedostatek železa. Tento stav je nejčastější příčinou anémie v Evropě a může k němu docházet při chronickém krvácení, například do gastrointestinálního traktu nebo při hypermenoree. Dalším důvodem je vegetariánská/veganská strava nebo méně často malabsorpční syndromy a genetické poruchy. Příčinou může být také časté darování krve, těhotenství nebo infekce *Helicobacterem pylori* [15].

3.3 Oxidační stres a Fentonova reakce

S patologií železa souvisí již zmiňované volné radikály, které jsou příčinou vzniku oxidačního stresu. Oxidační stres je stav přítomný ve všech aerobních organismech. Dochází k němu, pokud je narušená rovnováha mezi produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS) a dusíku (RNS) a kapacitou antioxidačního systému organismu. Volné radikály jsou vysoce reaktivní látky, které se účastní řetězových reakcí. V důsledku toho vznikají další ROS a RNS, které mají velký oxidační potenciál [16–18]. Mohou způsobovat trvalou modifikaci tkání, a tak se podílet na mutagenезi, karcinogenезi a stárnutí. Oxidované produkty DNA slouží zároveň jako biomarker oxidačního stresu [14].

Za nejvíce toxickou ROS je považován hydroxylový radikál ($\cdot\text{OH}$), který vzniká procesem zvaným Fentonova reakce (Rov. 1). Touto reakcí se rozumí chemická reakce

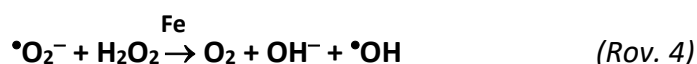
mezi peroxidem vodíku a přechodným kovem v nižším valenčním stavu. Volné ionty železa (Rov. 2) nebo mědi v redukované formě spouští Fentonovu reakci, při které dochází k redukci peroxidu vodíku za vzniku vysoce toxického hydroxylového radikálu [17, 19].



Fentonova reakce je však pouze jednou z reakcí Haber-Weissovy chemie. Aby reakce mohla proběhnout je zapotřebí redukovat Fe^{3+} na Fe^{2+} a to se děje v přítomnosti superoxidu ($\bullet O_2^-$) (Rov. 3) [17, 20].



Celý proces se dá shrnout Haber-Weissovou reakcí (Rov. 4). Superoxid reaguje v přítomnosti železa s peroxidem vodíku za vzniku kyslíku, hydroxylového aniontu a hydroxylového radikálu [20].



Reakce závisí na několika faktorech, především na účasti katalyzátoru (volného kovu), hodnotě pH a přítomnosti antioxidantů a chelátorů. Antioxidanty jsou látky, které s volnými radikály reagují, aby vyvážíly jejich negativní vliv. Fungují na principu redukce katalyzátoru nebo eliminují již vzniklé ROS/RNS jejich přeměnou na netoxickou molekulu, případně obojí. V těle se vyskytují v malých koncentracích a dělí se do dvou skupin [16, 17]. Vysokomolekulární sloučeniny zahrnují antioxidační enzymy jako je superoxidodismutáza (SOD), kataláza nebo glutathionperoxidáza (GPx) a také proteiny albumin nebo Tf. Mezi nízkomolekulární antioxidanty patří endogenní sloučeniny, například kyselina močová, kyselina lipoová, glutathion nebo ubichinol a dále exogenní antioxidanty získávané z potravy. Tam řadíme vitamíny C, E nebo polyfenolické sloučeniny včetně flavonoidů (Tab. 1) [16].

Tab. 1: Přehled antioxidantů [16].

Endogenní a exogenní antioxidanty	
Vysokomolekulární antioxidanty	Nízkomolekulární antioxidanty
Superoxiddismutáza	Kyselina močová
Kataláza	Kyselina lipoová
Glutathionperoxidáza	Kyselina askorbová (vitamín C)
Albumin	Tokoferol (vitamín E)
Transferrin	Glutathion
Metallothioneiny	Ubichinol
	Flavonoidy

Volné radikály působí patologicky pouze jsou-li v nadbytku. V nízkých koncentracích jsou dokonce životně potřebné. ROS/RNS jsou produkovány imunitním systémem jako obrana proti patogenům, jsou nezbytné pro funkci intracelulárních signálních systémů a také pro zrání buněčných struktur [21].

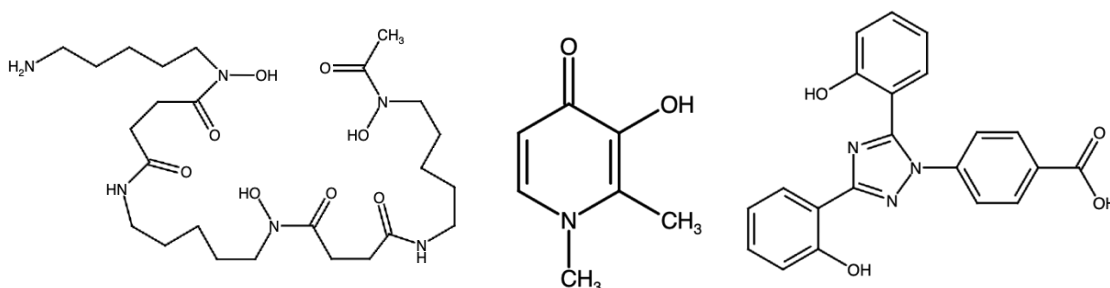
3.3.1 Chelatace železa

V případě patologických stavů spojených s nadbytkem nebo nadměrnou akumulací kovu v těle stejně tak jako při akutní a chronické intoxikaci kovy se dá použít k léčbě chelatační terapie. Chelatační činidla vážou ionty kovů, snižují jejich reaktivitu a odstraňují je z organismu ven [22]. Zároveň mohou chelátory působit jako chaperony a ovlivňovat distribuci i jiných kovů v těle [23].

Maximální koordinační číslo železa je 6, proto jsou hexadentátové chelátory neúčinnější, neboť zcela deaktivují volné železo. Vhodný chelátor by měl mít vysokou afinitu k iontům železa, nízkou toxicitu, perorální podání a schopnost pronikat biologickými membránami [14].

V klinické praxi se jako chelátory železa používají deferoxamin (DFO), deferipron (DFP), deferasirox (DFX) a dexrazoxan (Obr. 3). Několik dalších látek je předmětem výzkumu [24, 25]. Při výběru vhodného léku je třeba zvážit délku léčby, způsob podání a také jeho cenu. DFO byl prvním schváleným léčivem, ale jeho použití je limitováno nízkou absorpcí. Je tedy nezbytné jeho parenterální podání (intravenózní nebo

intramuskulární), které může být pacienty odmítáno. DFP a DFX sice nejsou tak účinnými chelátory jako DFO (nejsou hexadentátové), ale pozorujeme u nich větší adherenci k léčbě, a to z důvodu jejich perorálního podání [22].



Obr. 3: Struktury chelátorů železa: deferoxamin, deferipron a deferasirox.

3.4 Flavonoidy

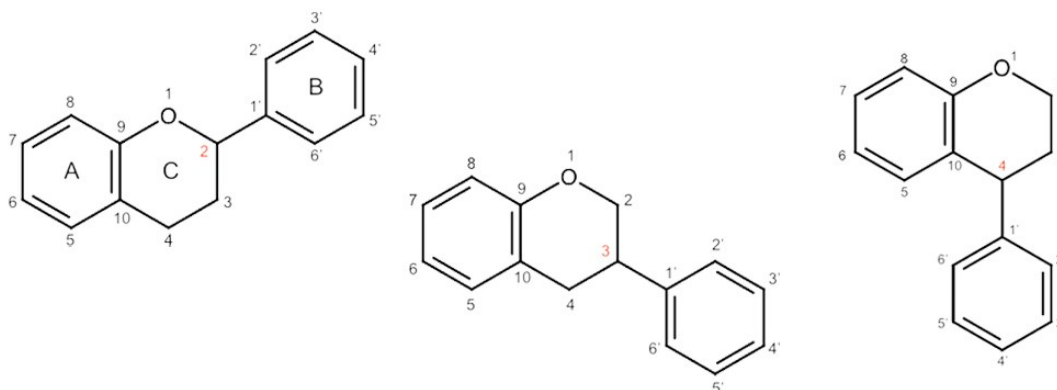
3.4.1 Charakteristika

Flavonoidy jsou přírodní, polyfenolické látky, které řadíme mezi sekundární metabolity rostlin. Jsou široce rozšířené, nacházejí se ve všech částech rostliny, kde jsou obsaženy uvnitř buněk nebo na povrchu rostlinných orgánů. Jejich bohatými zdroji jsou ovoce a zelenina, čaj, káva a červené víno. V rostlinách mají řadu funkcí. Udávají barvu květů a plodů, jsou zodpovědné za vůni, chrání rostlinu před různými vnějšími vlivy (např. odolnost vůči suchu a mrazu, ochrana proti škůdcům a ultrafialovému záření), působí jako signální molekuly a detoxikační látky. Nejen u rostlin, ale i u živočichů hrají řadu fyziologických rolí [26, 27].

Jejich konzumace je spojována s řadou příznivých účinků. Nejvíce je sledována jejich antioxidační aktivita, ale spektrum jejich působení je značně rozsáhlejší. Mají pravděpodobně protizánětlivé, antimutagenní a antikarcinogenní vlastnosti a ochranný účinek na kardiovaskulární a centrální nervový systém. Dále u nich byla popsána antimykotická, antivirová i antibakteriální aktivita. Mimo tyto pozitivní účinky jsou známy jako silné inhibitory některých enzymů cytochromu P450 [26, 28].

3.4.2 Chemická struktura

Strukturně se flavonoidy řadí do skupiny polyfenolických sloučenin neboli polyfenolů. Jejich základní skelet se skládá z 15 uhlíkového řetězce C6-C3-C6 obsahujícího dva benzenové kruhy (A a B), které jsou spojené tříuhlíkatým pyranovým kruhem (C) [29]. Na základě místa napojení kruhu B na kruh C rozlišujeme další strukturní podtypy. Flavonoidy, u nichž, je kruh B napojen v poloze 3 nazýváme isoflavonoidy. V případě napojení aromatického kruhu B na kruh C v poloze 4 se jedná o neoflavonoidy. Nejčastěji je však kruh B navázán v poloze 2. (Obr. 4). Na základě stupně oxidace a nasycení heterocyklického kruhu C rozdělujeme flavonoidy do dalších podskupin: flavony, flavonoly, flavanony, flavanoly (katechiny), isoflavony, anthokyany a chalkony [26].



Obr. 4: Základní chemické struktury: flavonoidy, isoflavonoidy, neoflavonoidy.

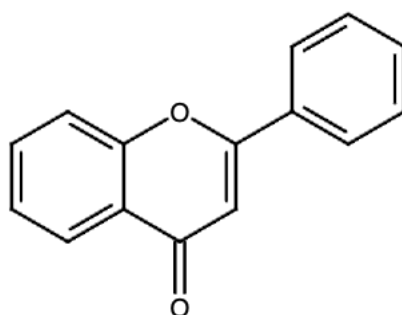
Flavonoidy můžeme rozdělit i podle stupně nasycení centrálního heterocyklického kruhu nebo na základě molekulové hmotnosti. Důležitým faktorem jsou i substituenty na kruzích A a B, které rozlišují jednotlivé flavonoidy a udávají jim specifické vlastnosti, například počet a poloha hydroxy skupin ovlivňuje jejich antioxidační kapacitu. V současnosti rozeznáváme více než 6000 různých flavonoidních sloučenin [29].

V rostlinách se mohou nacházet jako aglykony, což jsou volné formy flavonoidů, které ve své struktuře neobsahují cukr, anebo se vyskytují ve formě glykosidů. Glykosylované formy jsou častější a vznikají navázáním cukerného zbytku na strukturu flavonoidu. Nejčastěji je vázaným cukrem monosacharid, kterým může být glukóza, rhamnóza, galaktóza, arabinóza nebo xylóza. Převážně se vyskytují *O*-glykosidy, nicméně

i C-glykosylace je možná. O-glykosidy mají sacharidové substituenty vázané k hydroxylové skupině aglykonu, obvykle umístěné v poloze 3 nebo 7, zatímco C-glykosidy mají cukerné jednotky vázané k uhlíku aglykonu, obvykle na C6 nebo C8. Často se také vyskytují flavonoidní diglykosidy. Glykosylace je výhodná, neboť mění fyzikálně-chemické vlastnosti a biologickou aktivitu flavonoidů, zejména zvyšuje rozpustnost ve vodě a stabilitu, přičemž snižuje toxické a vedlejší účinky [27, 29, 30].

3.4.3 Podskupiny flavonoidů

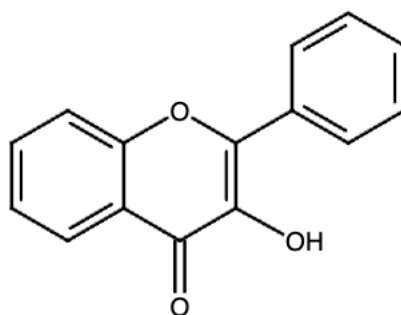
Flavony jsou jedny z nejdůležitějších a také široce rozšířených flavonoidů. Ve své struktuře obsahují dvojnou vazbu v poloze 2 a keton v poloze 4 kruhu C (Obr. 5). Většina flavonů má hydroxylovou skupinu v poloze 5 kruhu A a další hydroxylové skupiny podle taxonomického zařazení dané rostliny. Vyskytují se převážně jako 7-O-glykosidy, s navázanou glukózou, ale mohou být i ve formě C-glykosidů. Zajímavostí je, že cukerných zbytků mohou obsahovat i více než jeden. Nacházejí se hojně v celeru, petrželi, červené paprice, heřmánku, mátě, *Ginkgo biloba* a citrusových plodech. Do této podskupiny patří apigenin, luteolin a tangeritin. Flavony jsou známé pro své biologické účinky, např. příznivé účinky apigeninu souvisí s transkripcí genů a expresí proteinů [26, 29, 31].



Obr 5: Chemická struktura flavonů.

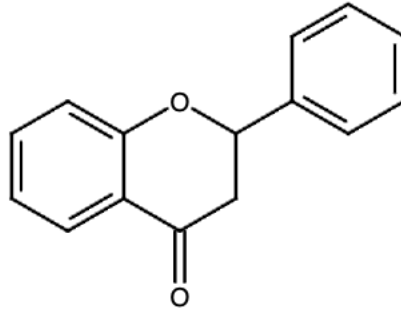
Flavonoly jsou známy jako 3-hydroxyflavony, ve srovnání s flavony mají totiž hydroxylovou skupinu v poloze 3 kruhu C, která může být glykosylována (Obr. 6). Pozice 5 a 7 na kruhu A jsou také nahrazeny hydroxylovými skupinami. Flavonoly jsou pravděpodobně nejrozsáhlejší podskupinou flavonoidů zastoupených v ovoci a zelenině, jsou hojně obsaženy v některých druzích, jako je brokolice, cibule, chřest, kapusta, jablka

a hroznové víno. Jejich příjem v potravě je spojen s příznivými účinky na lidské zdraví, které zahrnují antioxidační potenciál a kardioprotektivní a protirakovinné účinky. Flavonoly obsažené v rostlinných tkáních filtrují škodlivé UV záření a chrání tak DNA. Nejvíce studovanými sloučeninami jsou kaempferol, kvercetin, myricetin a fisetin [26, 31]. Nejrozšířenějším flavonolem je kvercetin. Kvercetin inhibuje hepatokarcinogenezi zprostředkovanou ROS tím, že reguluje antioxidační obranné systémy. Vyskytuje se jak ve formě aglykonu, tak ve formě *O*-glykosidu. V případě *O*-glykosylace na C3 se jedná o rutin, což je pravděpodobně nejrozšířenější flavonolový glykosid v rostlinné rži [29, 31].



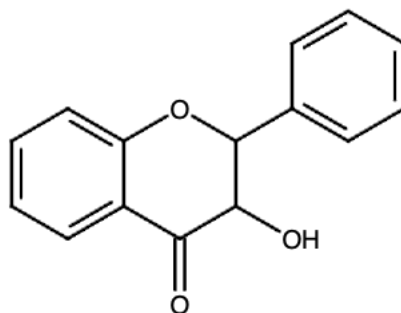
Obr. 6: Chemická struktura flavonolů.

Flavanony jsou důležitou skupinou flavonoidů, obsaženou téměř výhradně v citrusových plodech, jako jsou pomeranče a citrony. Jsou spojovány s řadou prospěšných účinků díky svým schopnostem vychytávat volné radikály, čímž fungují jako účinné antioxidanty a významně posilují funkci imunitního systému. Dále mají protizánětlivé účinky a snižují hladinu krevních lipidů a cholesterolu. Mezi příklady této třídy flavonoidů patří hesperidin, naringenin a eriodiktyol. Tyto sloučeniny způsobují, že šťáva a kůra citrusových plodů má hořkou chuť. Obsah flavanonů se liší mezi jednotlivými odrůdami citrusů. Jsou nazývané také jako dihydroflavony díky nasycenému kruhu C (Obr.7). Strukturální rozdíl od flavonů spočívá pouze v nasycení dvojně vazby mezi polohami C2 a C3 [26, 31].



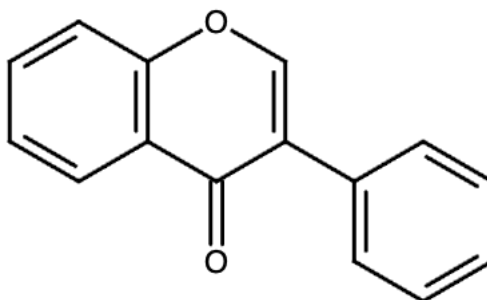
Obr. 7: Chemická struktura flavanonů.

Flavanoly, označované také jako katechiny nebo flavan-3-oly, jsou 3-hydroxyderiváty flavanonů (Obr. 8). Od jiných flavonoidů se liší nepřítomností dvojné vazby mezi polohami 2 a 3. Různé flavanoly se vyznačují rozdíly v hydroxy substituci na kruzích A, B a C. Jako monomery tvoří základní strukturální jednotku pro oligomery a polymery s názvem proanthokyanidiny [26, 31]. Flavanoly vyvolávají uvolňování oxidu dusnatého do krve. U kuřáků tak může příjem flavanolů zlepšit některá poškození cév. Dlouhodobá konzumace potravin bohatých na flavanoly vede k trvalému zlepšení funkce endotelu a k prevenci vzniku kardiovaskulárních onemocnění [32]. Zástupci flavanolů jsou katechin, epikatechin, epikatechin-galát, epigalokatechin a epigalokatechin-galát. Ve vysoké koncentraci se nacházejí v *Camellia sinensis* neboli čajovníku. Konzumace čaje je jedním z nejdůležitějších zdrojů těchto flavonoidů. Kromě toho jsou bohatými zdroji jablka, červené hrozny, mango, hrušky a švestky. Nacházejí se ve větší míře i v kakau a červeném víně [29].



Obr. 8: Chemická struktura flavanolů.

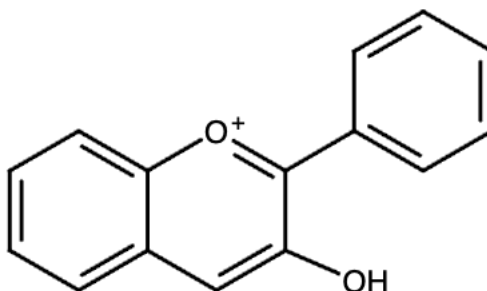
Isoflavony (Obr. 9) jsou v rostlinné říši rozšířeny jen omezeně, přesto jsou významnou podskupinou flavonoidů. Jejich výskyt je omezen na zástupce čeledi bobovité, vyskytují se převážně v sóji a dalších luštěninách, jako je lupina, fazole a cizrna [26, 29]. Důležitými dietetickými isoflavony jsou genistein a daidzein. Jelikož jsou strukturně podobné estradiolu, tak fungují jako fytoestrogeny. Váží se na estrogenové receptory a vyvolávají estrogení nebo antiestrogení účinky, v závislosti na prostředí. Předpokládá se, že strava bohatá na isoflavony má příznivý vliv na hormonální stav, regulaci menstruačního cyklu a zdraví při menopauze. Mají protizánětlivé a antioxidační vlastnosti a pozitivní vliv na kardiovaskulární systém. Genistein je potenciální terapeutická látka pro léčbu nebo prevenci různých druhů rakoviny [31, 32].



Obr. 9: Chemická struktura isoflavonů.

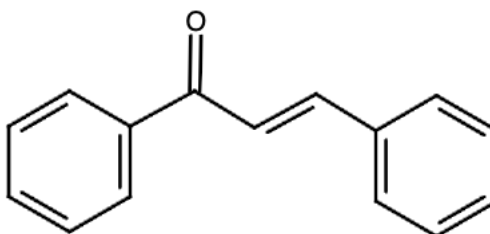
Anthokyany jsou rostlinné pigmenty, které dodávají květům a plodům červenou, fialovou a modrou barvu. V rostlinách jsou přítomny v glykosylované formě jako polyhydroxy a polymethoxy deriváty, jejich aglykony se nazývají anthokyanidiny (Obr. 10). Jednotliví zástupci se od sebe odlišují počtem a polohou hydroxylových a methoxylových skupin. Barva antokyanu závisí na pH a také na metylaci nebo acylaci hydroxylových skupin na kruzích A a B. Nejčastěji studovanými antokyany jsou kyanidin, delphinidin, malvidin, pelargonidin, peonidin a petunidin. Vyskytují se hojně v ovoci a zelenině, například v borůvkách, brusinkách, ostružinách, rajčatech a lilku [26, 31]. Anthokyany mají antioxidační, protinádorové, antibakteriální, antidiabetické, antiangiogenní vlastnosti a jsou důležité pro udržení dobrého zraku [32]. Různé

anthokyany mají různou antioxidační aktivitu v závislosti na jejich struktuře. Používají se také jako potravinářská barviva [31].



Obr. 10: Chemická struktura anthokyanidinů.

Chalkony se vyznačují absencí kruhu C základní struktury, proto je lze také pojmenovat jako flavonoidy s otevřeným řetězcem. Ačkoliv patří do skupiny flavonoidů, jsou zároveň považovány za jejich prekurzory. Jedná se o α,β -nenasycené ketony s reaktivní ketoethylenovou skupinou, mající konjugované dvojně vazby ve své struktuře (Obr 11). V důsledku přítomnosti chromoforu (-CO-CH=CH-) jsou chalkony barevné sloučeniny. Mezi hlavní příklady chalkonů patří isoliquiritigenin, likochalkon A, floridzin, floretin a naringin dihydrochalkon. Chalkony se ve významném množství vyskytují v jedlých rostlinách, rajčatech, hruškách, jahodách a některých pšeničných produktech. Vykazují řadu terapeutických vlastností, např. antioxidační, protizánětlivou, antimalarickou, antivirovou a protinádorovou aktivitu. Mají dále vliv na kardiovaskulární, cerebrovaskulární a neurovaskulární systém [26, 33].



Obr. 11: Chemická struktura chalkonů.

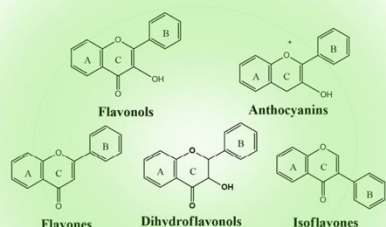
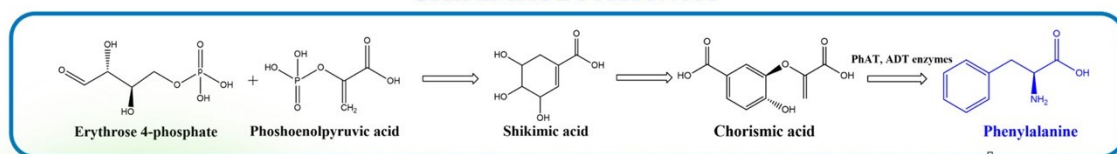
3.4.4 Biosyntéza flavonoidů

Biosyntéza flavonoidů probíhá převážně v cytosolu a kombinuje několik významných biosyntetických cest, tj. šikimátovou, fenylypropanoidovou a polyketidovou dráhu [34]. Hlavní roli hraje šikimátová cesta, která poskytuje aminokyselinu fenylalanin. Začíná aldolovou kondenzací fosfoenolpyruvátu a D-erythrózy-4-fosfátu, vedoucí ke vzniku kyseliny šikimové a následně kyseliny chorismové, jako konečného produktu této cesty. Kyselina chorismová se poté působením enzymů prephenát-aminotransferázy (PhAT) a arogenát-dehydratázy (ADT) přeměňuje na fenylalanin [35, 36].

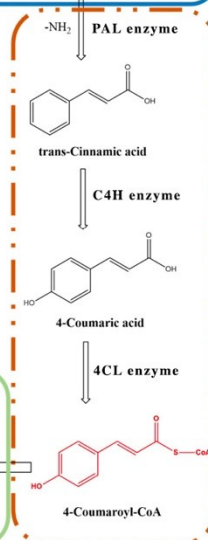
Fenylalanin vstupuje do druhé cesty biosyntézy. První krok reakce ve fenylypropanoidní dráze katalyzuje enzym fenylalanin amoniakální lyáza (PAL), která přeměňuje fenylalanin na kyselinu *trans*-skořicovou za současného odstranění amonného iontu. V dalším kroku působením cinamát-4-hydroxylázy (C4H) vzniká kyselina 4-kumarová, která se dále přeměňuje přidáním jednotky koenzymu A (CoA) na 4-kumaroyl-CoA za pomoci 4-kumarát-CoA-ligázy (4CL) [36, 37].

Dalším potřebným prekurzorem je malonyl-CoA, který vzniká karboxylací acetyl-CoA acetátovou (neboli polyketidovou) cestou. Spojením těchto cest, tedy kondenzací jedné molekuly 4-kumaroyl-CoA a tří molekul malonyl-CoA, vzniká chalcon jako prekurzor ostatních flavonoidů. Tato reakce je katalyzována enzymem chalcon syntáza (CHS) a představuje začátek flavonoidní cesty. Různé typy flavonoidů jsou pak výsledkem působení dalších enzymů. Sloučeniny podléhají modifikacím jako je hydroxylace, glykosylace nebo metylace, jejichž výsledkem je obrovská škála flavonoidů [36, 38]. Biosyntézu shrnují Obr. 12 a 13.

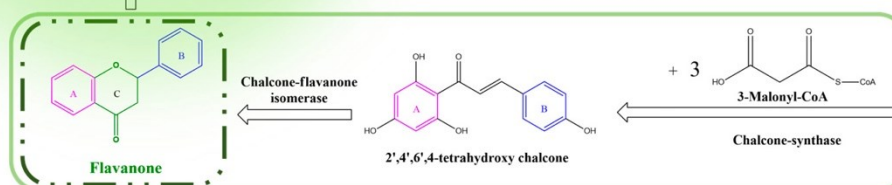
SHIKIMATE PATHWAY



PHENYLPROPANOID PATHWAY

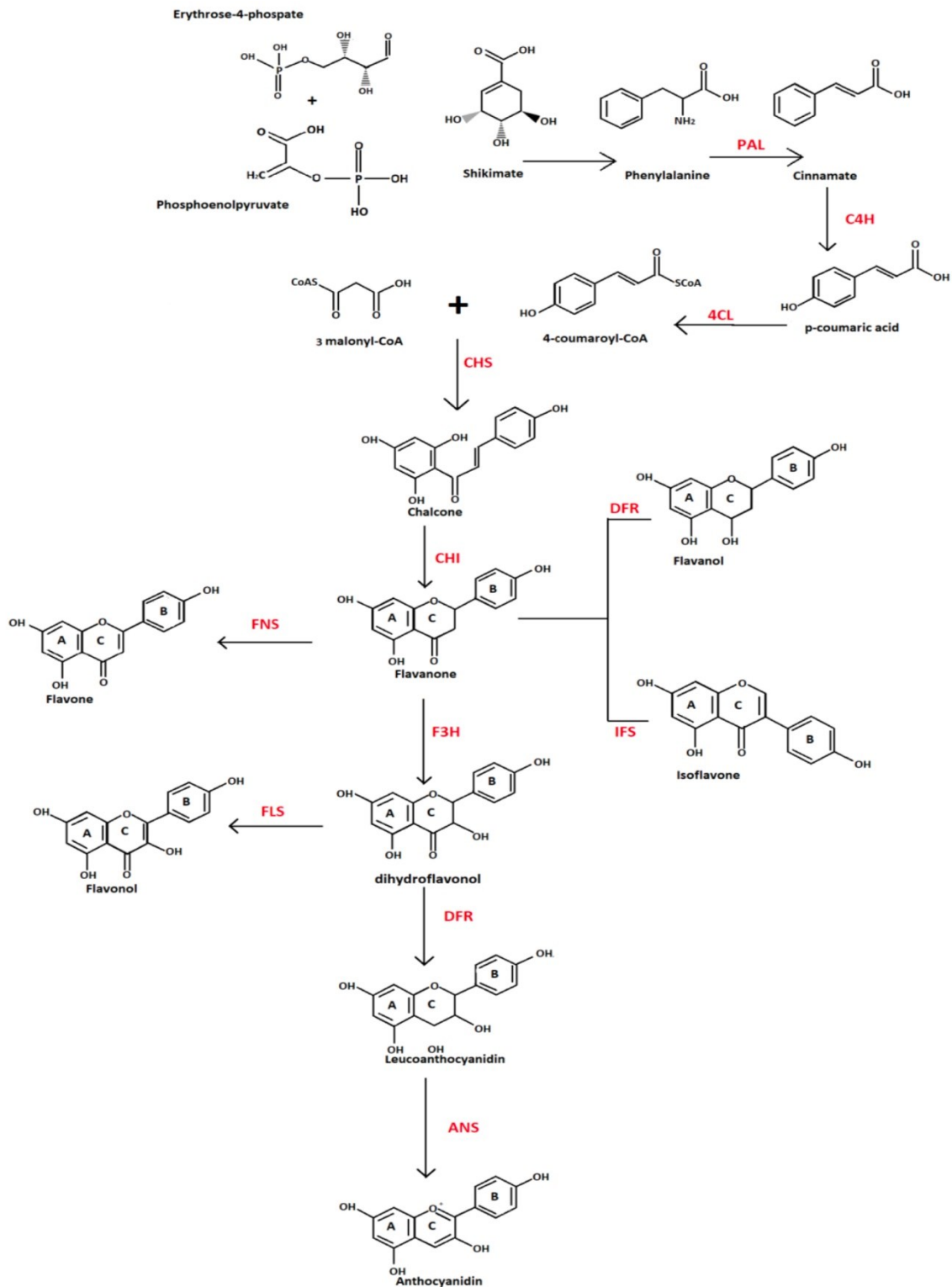


FLAVONOID PATHWAY



Obr. 12: Shrnutí biosyntetických cest flavonoidů: modře šikimátová cesta, oranžově fenylpropanoidní cesta, zeleně flavonoidní cesta – převzato a upraveno [35].

PhAT: prefenát-aminotransferáza, ADT: arogenát-dehydratáza, PAL: fenylalanin amoniakální lyáza, C4H: cinamát-4-hydroxyláza, 4CL: 4-kumarát-CoA-ligáza.



Obr. 13: Shrnutí biosyntézy flavonoidů – převzato a upraveno [38].

PAL: fenylalanin amoniakální lyáza, C4H: cinamát-4-hydroxyláza, 4CL: 4-kumarát-CoA-ligáza, CHS: chalkon syntáza, CHI: chalkon isomeráza, FNS: flavon syntáza, F3H: flavanon-3-hydroxyláza, FLS: flavonol syntáza, DFR: dihydroflavonol reduktáza, ANS: anthokyanidin syntáza, IFS: isoflavonoid syntáza.

3.4.5 Biodostupnost a metabolismus flavonoidů

Flavonoidy vykazují různou míru absorpce a biodostupnosti v závislosti na své struktuře a fyzikálně-chemických vlastnostech. Po příjmu flavonoidů potravou dochází k jejich masivnímu metabolismu ještě před dosažením systémového oběhu. To nastává již v buňkách tenkého střeva. Absorpce flavonoidů z tenkého střeva je lepší než z tlustého střeva a je hlavním místem jejich limitované absorpce. Nejlépe se vstřebávají isoflavony, dále středně dobře flavanoly, flavanony a nejhůře proanthokyanidiny a anthokyany. Stupeň absorpce závisí kromě typu flavonoidu i na dalších faktorech, mezi které patří dávkování, předcházející strava, rozdíly mezi pohlavími, individuální genetické vlastnosti, mikrobiální osídlení tlustého střeva a také matrice, ve které jsou flavonoidy konzumovány [27, 32, 39]. Biologická dostupnost flavonoidů se tak u jednotlivých lidí liší, ale všeobecně je nízká a jejich plazmatické koncentrace po příjmu běžné stravy nepřekračují 1 μM [39].

Většina flavonoidů je přítomna ve stravě ve formě β -glykosidů a před vstřebáním musí dojít k jejich deglykosylaci, tedy k odstranění cukerného zbytku z jejich struktury. K deglykosylaci dochází jak v tenkém, tak tlustém střevě v závislosti na typu cukerné části. Flavonoidní glykosidy mohou být hydrolyzovány laktázou-florizin hydrolázou (LPH), která se nachází v kartáčovém lemu tenkého střeva savců, nebo cytosolovou β -glukosidázou (CBG) s širokou specifitou v enterocytech [27, 40]. Po hydrolýze mohou aglykony volně pronikat buněčnými membránami střevních buněk prostřednictvím pasivní difuze díky dostatečně zvýšené hydrofobicitě. Jedinou podtřídou flavonoidů, která se v potravě nachází v neglykosylované formě jsou flavanoly. Jako aglykony mohou být absorbovány v tenkém střevě. Kromě monomerů se však katechiny vyskytují i jako oligomery ve formě proanthokyanidinů, které vzhledem ke své velikosti, musí být nejprve degradovány na menší sloučeniny. Některé glykosylované flavonoidy jsou aktivně transportovány do epiteliálních buněk prostřednictvím aktivního sodík-dependentního glukózového transportéru SGLT1. Počet a typ glykosylu jsou důležitými faktory ovlivňující vstřebávání. Kinetika absorpce se také liší v důsledku dalších funkčních skupin obsažených ve struktuře látky [27, 39, 41]. Glykosidy, které nejsou substráty pro LPH nebo CBG jsou transportovány do tlustého střeva, kde mohou

být hydrolyzovány střevními bakteriemi. Absorpční kapacita tlustého střeva je však mnohem menší než tenkého střeva [32].

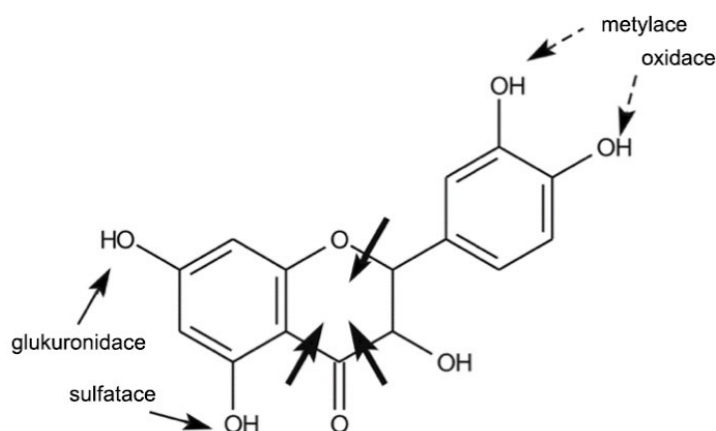
Kromě výše zmíněných vlastností, ovlivňují rozsah vstřebávání a tím biologickou dostupnost i různé membránové přenašeče. ABC (ATP binding cassette) transportéry fungují po navázání jednotky adenosintrifosfátu (ATP). Tyto transportéry se podílí na regulaci střevního efluxu a řadíme mezi ně například P-glykoprotein (P-gp), protein multirezistence (MRP) nebo protein rezistence vůči rakovině prsu (BCRP). Střevní eflux omezuje vstřebávání některých flavonoidů, v důsledku čehož snižuje množství, které se dostává do systémové cirkulace. Vzhledem k tomu, že ABC transportéry jsou umístěny v buněčných membránách celého organismu, ovlivňují také distribuci flavonoidů do cílových tkání a jejich eliminaci [27].

V metabolismu flavonoidů existují 2 oddíly. První kompartment tvoří tkáně, včetně jater, tenkého střeva a ledvin [42]. Jakmile se flavonoidní aglykony dostanou do střevních epitelových buněk, enzymy fáze II produkují odpovídající konjugované metabolity. Tenké střevo je hlavní orgán zodpovědný za glukuronidaci flavonoidů, tato reakce je zprostředkována enzymy uridin-5'-difosfát glukuronyltransferázami (UGT). Nadrodina enzymů UGT katalyzuje glukuronidaci velkého množství funkčních skupin. Mezi další biotransformační reakce řadíme sulfataci prostřednictvím sulfotransferáz (SULT) a metylaci prostřednictvím katechol-O-metyltransferáz (COMT) v cytosolu. Vstřebané flavonoidy se vážou na albumin a portální žilou jsou transportovány do jater, kde podléhají dalším metabolizačním reakcím [27, 40]. V játrech probíhají 2 typy metabolických reakcí: oxidační a vazebné. V I. fázi dochází k oxidačním reakcím, které jsou zprostředkovány enzymy cytochromu P450. Vazebné neboli konjugační reakce se týkají především polárních funkčních skupin, které jsou spojeny s jinou endogenní látkou. Enzymy, účastníci se II. fáze metabolismu již byly zmíněny a jedná se o UGT, SULT a COMT. Konjugační reakce jsou u člověka velmi účinné, o čemž svědčí skutečnost, že flavonoidy se v plazmě nebo moči vyskytují převážně jako konjugáty a volné aglykony téměř nenajdeme (s výjimkou katechinů) [41].

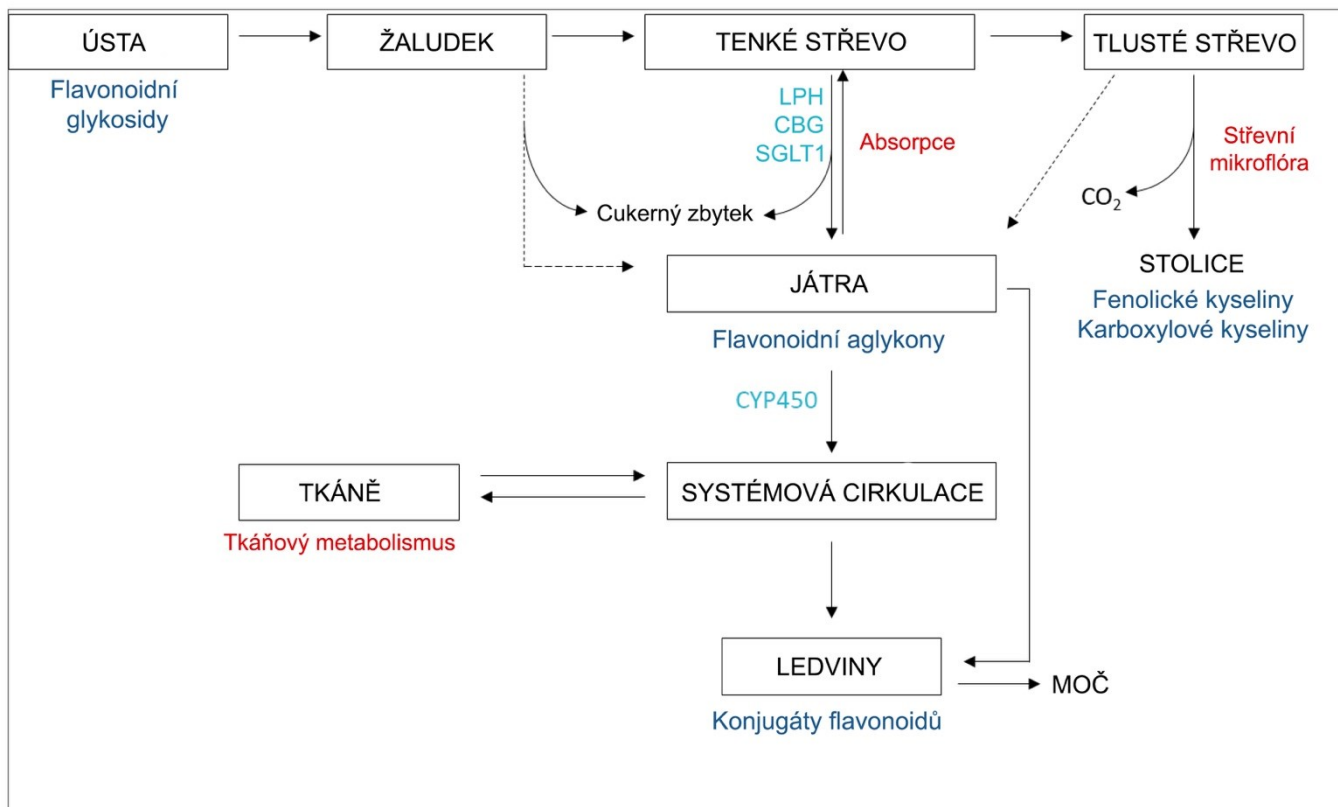
Druhý oddíl tvoří tlusté střevo. Do tlustého střeva se dostávají flavonoidy, které se nevstřebaly z tenkého střeva a dále flavonoidy, které byly vstřebány a následně byly vyloučeny společně se žlučí jako konjugované metabolity. Střevní mikrobiom se skládá

převážně z anaerobních bakterií, produkujících různé enzymy, jako jsou glukuronidázy, esterázy nebo sulfatázy, které se mohou podílet na metabolických reakcích [27, 39, 40]. Působením těchto enzymů mikroorganismy produkují volné flavonoidní aglykony, které se mohou znovu vstřebat skrze enterohepatální oběh nebo jsou rozloženy na menší sloučeniny rozštěpením heterocyklického kruhu. Typ štěpení kruhu závisí na typu flavonoidu a na rozsahu oxidace heterocyklu. Na základě toho vznikají fenylactové a fenylpropionové kyseliny nebo valerolaktony jako degradační produkty. Ty se principiálně lépe absorbují a dosahují vyšších plazmatických koncentrací než parentní flavonoidy. Fenylkarboxylové kyseliny podléhají dalšímu bakteriálnímu rozkladu a enzymatickým přeměnám v tělesných tkáních, v důsledku toho se fenylpropionové kyseliny oxidují na kyseliny benzoové [27, 39]. Předpokládá se, že tyto vzniklé katabolity s nižší molekulovou hmotností odrážejí fyzikální účinek svých mateřských flavonoidních sloučenin [43].

Biologická dostupnost je klíčovým faktorem určujícím biologickou aktivitu flavonoidů *in vivo*. Konjugace ovlivňuje vlastnosti flavonoidů, jako je velikost, hmotnost, náboj a hydrofobicita, což může ovlivnit rozpustnost a schopnost procházet membránami, stejně tak jako rychlost vylučování, a tedy poločas v plazmě. Také enterohepatální cirkulace přispívá k zvýšení plazmatické hladiny a poločasu flavonoidů. Bylo prokázáno, že flavonoidy ovlivňují zastoupení bakterií ve střevě a tím ovlivňují svůj vlastní metabolismus a biodostupnost. To naznačuje, že dietní flavonoidy mohou působit jako prebiotikum pro střevní mikrobiom [27, 40, 41].



Obr. 14: Potenciální místa biotransformace a štěpení kruhu flavonoidů – převzato a upraveno [27].



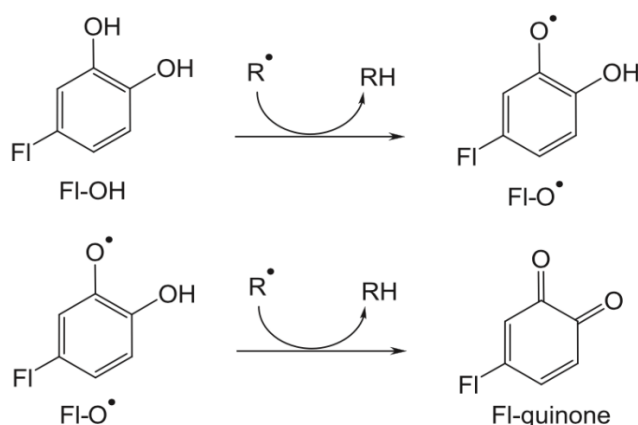
Obr. 15: Schéma metabolismu flavonoidů – převzato a upraveno [32].

LPH: laktáza-florizin hydroláza, CBG: cytosolová β -glukosidáza, SGLT1: sodík-dependentní glukózový transportér 1, CYP450: cytochrom P450.

3.4.6 Antioxidační a pro-oxidační působení flavonoidů

Flavonoidy, které jsou součástí lidské stravy, disponují různými biologickými účinky. Nepochybně nejzkoumanější je jejich antioxidační aktivita, která byla doložena několika epidemiologickými a *in vitro* studiemi [29, 44]. Vystavení organismu nadměrnému oxidačnímu stresu vede k destrukci biomolekul a náchylnosti ke vzniku chronických onemocnění. Buňky využívají různé způsoby a enzymatické systémy, aby zabránily oxidačnímu poškození způsobenému nadměrným množstvím volných radikálů. V některých situacích je kapacita endogenních antioxidačních systémů přetížena. V těchto případech pak mohou buňky využít exogenní antioxidanty dodávané ve stravě, jako jsou vitamíny, karotenoidy a flavonoidy [18]. Přičemž flavonoidy jsou nejvíce zastoupené antioxidanty v běžné stravě [45].

Mechanismy antioxidačního působení jsou rozsáhlé, řadíme zde přímé vychytávání ROS, aktivaci antioxidačních enzymů, chelataci kovů, redukcí α -tokoferylových radikálů, inhibici oxidáz, zmírnění oxidačního stresu způsobeného oxidem dusnatým, zvýšení hladiny kyseliny močové a zvýšení antioxidačních vlastností nízkomolekulárních antioxidantů. Flavonoidy jsou schopny vychytávat volné radikály, jako jsou superoxidové, peroxylové, alkoxylové a hydroxylové, a to přímo donací vodíkových atomů. Radikály se poté stávají neaktivními za vzniku stabilní chinonové struktury (Obr. 16) [44, 46].



Obr. 16: Vychytávání reaktivních forem kyslíku flavonoidy [46].

R•: volný radikál, reaktivní forma kyslíku, FI-O•: flavonoidní radikál, který může reagovat s druhým radikálem za vzniku stabilní chinonové struktury.

Schopnost přímo vychytávat radikály závisí na struktuře a substituentech daného flavonoidu. Hlavními požadavky jsou přítomnost katecholové struktury (*ortho*-dihydroxy skupina) v kruhu B a 2,3-dvojná vazba v konjugaci s 4-oxo skupinou v kruhu C. Takové rozložení zajistí delokalizaci elektronů. Důležité jsou také hydroxy skupiny v poloze C3 a C5. Další hydroxylová skupina v kruhu B dále zvyšuje vychytávací aktivitu. Naopak přítomnost pouze jedné hydroxy skupiny v kruhu B tuto aktivitu snižuje, stejně jako odstranění nebo glykosylace 3-hydroxylové skupiny na kruhu C [44, 46].

Flavonoidy dále také inhibují enzymy, které se podílejí na vzniku volných radikálů. Mezi tyto enzymy řadíme xantinoxidázu, proteinkinázu C, mitochondriální sukcinoxidázu, NADPH-oxidázu, cyklooxygenázu a lipooxygenázu [44, 46].

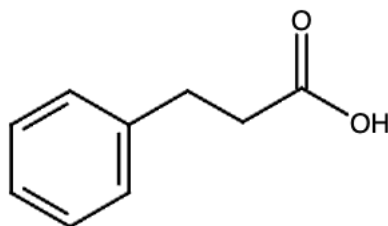
K antioxidačním vlastnostem přispívá i jejich schopnost účinně chelatovat ionty kovů. Volné železo a měď se podílí na tvorbě toxických radikálů. Flavonoidy tvoří stabilní komplexy s těmito kovy a zabraňují tak jejich pro-oxidačnímu působení [47]. Antioxidační aktivita flavonoidů *in vivo* není dostatečně zdokumentovaná. Obecně platí, že v průběhu metabolismu se tato aktivita snižuje, avšak metabolity jsou stále schopny podílet se na antioxidačním účinku [18].

Stejně jako jiné antioxidanty mohou i flavonoidy mít za určitých okolností pro-oxidační účinek. Jejich vlastnosti závisí především na koncentraci, ve vyšších koncentracích se mohou chovat jako pro-oxidanty. Tyto jejich pro-oxidační účinky se následně mohou projevit *in vivo*, pokud se do oxidačních procesů zapojí volné ionty přechodných kovů. Flavonoidy jsou vedle chelatace schopny také redukovat ionty přechodných kovů, jako je železo a měď, které poté katalyzují vznik iniciačních radikálů. Ve zdravém těle jsou ionty kovů z větší části vázány na bílkoviny (např. ferritin) a neúčastní se tak radikálových reakcí. Pokud však dojde k poškození tkání, ionty kovů se mohou uvolňovat a podporovat tak pro-oxidační působení. Tyto pro-oxidační účinky bývají nežádoucí, ale mohou být i prospěšné, například při indukci apoptózy nádorových buněk [18, 46].

3.5 Testované látky

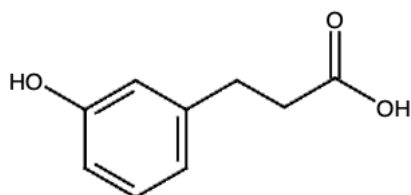
Fenylpropionové kyseliny vznikají degradací polyfenolů enzymy střevní mikroflóry. Tyto metabolity se následně mohou lépe vstřebávat, v důsledku čehož jsou nalezeny mimo stolici i v plazmě a moči. Nález degradačních produktů flavonoidů v plazmě vede k otázce, zda jsou fyziologicky relevantní, nebo je lze považovat pouze za biomarkery stravy bohaté na polyfenoly [48, 49]. Strukturně se jedná o organické sloučeniny obsahující benzenové jádro konjugované s kyselinou propionovou [50].

3-fenylpropionová kyselina je monokarboxylová kyselina substituovaná fenylem v poloze 3 (Obr. 17) [1]. Jedná se o hlavní fenolický degradační produkt pro naringin [48]. U lidí byla pozorována jako katabolit tlustého střeva po konzumaci malin [51]. Bylo také zjištěno, že může podporovat růst různých kmenů bakterie *Escherichia coli* [52].



Obr. 17: 3-fenylpropionová kyselina.

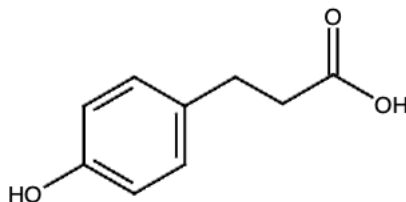
3-(3-hydroxyfenyl)propionová kyselina se od předešlé sloučeniny liší navíc substitucí OH-skupiny na C3 na fenylovém jádře (Obr. 18). Nachází se jako obsahová látka například v rostlině *Ginkgo biloba* [1]. Byla identifikována jako hlavní koncový produkt metabolismu kyseliny chlorogenové a rutinu, kde vzniká dehydroxylací z kyseliny 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionové v poloze 4 fenylového kruhu [48]. Jedná se o známý metabolit rozkladu flavonolů, flavanolů, flavanonů a hydroxycinnamátů v tlustém střevě [49]. U kyseliny 3-(3-hydroxyfenyl)propionové byl prokázán silný vazodilatační efekt. Po jejím podání byl pozorován okamžitý pokles krevního tlaku související s přímými vazodilatačními účinky, které jsou založeny na periferním působení na cévní řečiště a jsou závislé na oxidu dusnatém [53]. Také může podporovat růst *E. coli* [52].



Obr. 18: 3-(3-hydroxyfenyl)propionová kyselina.

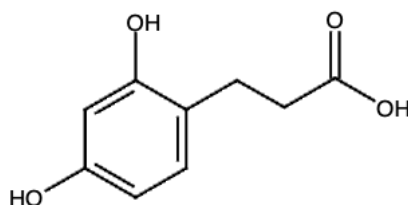
3-(4-hydroxyfenyl)propionová kyselina má OH-skupinu navázanou v poloze 4 fenylového substituentu (Obr. 19). Můžeme ji pojmenovat také jako kyselina floretová [1]. Nachází se v černých olivách, kde vykazuje antioxidační účinky [54]. Mimo to se jedná o degradační produkt naringinu [48]. Její vznik byl pozorován také při působení

lidské střevní mikrobioty na C-glykosid vitexin a flavon apigenin [55]. Současně byla detekována jako kolonický metabolit katechinu [56].



Obr. 19: 3-(4-hydroxyfenyl)propionová kyselina.

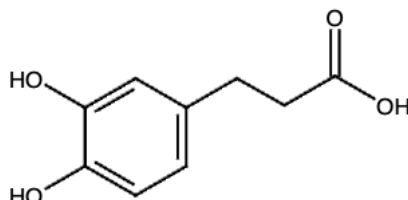
3-(2,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina se vyznačuje dihydrosubstitucí v polohách 2 a 4 na fenylovém zbytku navázaném na propionové kyselině (Obr. 20) [1]. V minulosti byla izolována například z listů a plodů *Ficus carica* [57]. Také se jedná o metabolit vznikající při kolonickém metabolismu flavonoidů luteolinu, naringeninů a myricetinu [58].



Obr. 20: 3-(2,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina.

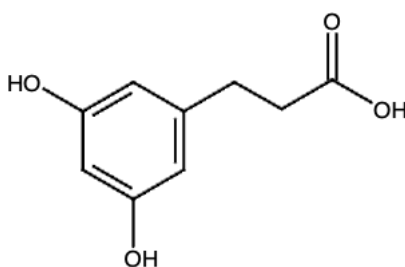
3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina (Obr. 21), triviálním názvem dihydrokávová kyselina, je metabolit kávové kyseliny [1]. Strukturně se podobá dopaminu. Nachází se v kávě, olivách a dále například v rostlině *Matricaria recutita*. Současně vzniká v tlustém střevě jako metabolit epikatechinu a katechinu [58]. Analyzována byla i jako produkt metabolismu C-glykosidu homoorientinu a flavonu luteolinu [55]. Vyznačuje se řadou zdraví příznivých účinků, jako je antimikrobní a antivirová aktivita nebo hypolipidemické, antidiabetické a protizánětlivé vlastnosti

[59]. Protizánětlivé účinky jsou vysvětleny snížením produkce prozánětlivého interleukinu IL-6 inhibiční metylací DNA [60]. U dihydrokávové kyseliny byly taktéž pozorovány vazodilatační účinky, avšak při podání ve vyšší koncentraci v porovnání s kyselinou 3-(3-hydroxyfenyl)propionovou [53].



Obr. 21: 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina.

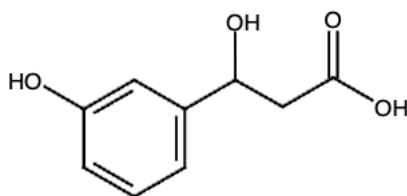
3-(3,5-dihydroxyfenyl)propionová kyselina má 2 hydroxy skupiny navázané na fenylovém jádře v polohách 3 a 5 (Obr. 22) [1]. Jedná se o metabolit alkylresorcinolů, nacházejících se ve významné míře v celozrnné pšenici a žitu. Příjem těchto celozrnných obilovin souvisí s vylučováním 3-(3,5-dihydroxyfenyl)propionové kyseliny v moči, proto může sloužit jako jejich biomarker [61]. Zároveň je také mikrobiálním metabolitem epigalokatechin-galátu, který se vyskytuje v listech zeleného čaje [62].



Obr. 22: 3-(3,5-dihydroxyfenyl)propionová kyselina.

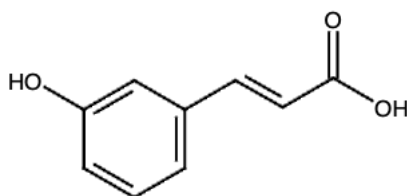
3-(3-hydroxyfenyl)-3-hydroxypropionová kyselina je dihydroxymonokarboxylová kyselina (Obr. 23) [1]. Byla nalezena ve významně vyšší koncentraci u dětí s poruchou autistického spektra. Pravděpodobně pochází z narušeného metabolismu fenylalaninu přemnoženou střevní mikroflórou, např. druhy rodu *Clostridium* [63]. Také byla

detekována jako metabolit v lidské moči po konzumaci flavan-3-olů ze zeleného čaje [64].



Obr. 23: 3-(3-hydroxyfenyl)-3-hydroxypropionová kyselina.

3-kumarová kyselina je hydroxyderivát kyseliny skořicové (Obr. 24). Má navázanou hydroxyskupinu v poloze *meta* a oproti ostatním testovaným látkám obsahuje navíc dvojnou vazbu (je to tedy prop-2-enová kyselina). Nachází se například v rostlině *Rubus idaeus* [1]. A současně je jedním z koncových metabolitů nejběžnějšího flavonoidu kvercetinu. Ve vyšší koncentraci vykazuje určité vazodilatační účinky [53].



Obr. 24: 3-kumarová kyselina.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použitý materiál a pomůcky

4.1.1 Chemikálie

- chlorid železitý (FeCl_3) (Sigma-Aldrich, Německo)
- testované látky
 - kyselina 3-fenylpropionová
 - kyselina 3-(3-hydroxyfenyl)propionová
 - kyselina 3-(4-hydroxyfenyl)propionová
 - kyselina 3-(2,4-dihydroxyfenyl)propionová
 - kyselina 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová
 - kyselina 3-(3,5-dihydroxyfenyl)propionová
 - kyselina 3-(3-hydroxyfenyl)-3-hydroxypropionová
 - kyselina 3-kumarová

Všechny testované látky byly získány od firmy Sigma-Aldrich (Německo).
- chemikálie pro přípravu pufrů
 - octan sodný bezvodý (CH_3COONa) (Penta, ČR)
 - kyselina octová (CH_3COOH) (Penta, ČR)
 - tris(hydroxymetyl)aminometan (TRIS) (Sigma-Aldrich, Německo)
- další látky
 - kyselina salicylová (Sigma-Aldrich, Německo)
 - disodná sůl etylendiamintetraoctové kyseliny (Na_2EDTA) (Sigma-Aldrich, Německo)
 - peroxid vodíku (H_2O_2 , 30%) (Sigma-Aldrich, Německo)
 - kyselina fosforečná (H_3PO_4 , 85%) (Sigma-Aldrich, Německo)
 - katechol (Sigma-Aldrich, Německo)
 - kyselina 2,3-dihydroxybenzoová (2,3-DHBA) (Sigma-Aldrich, Německo)

- kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (2,5-DHBA) (Sigma-Aldrich, Německo)
- triethylamin (Sigma-Aldrich, Německo)
- kyselina chlorovodíková (HCl, 35%) (Penta, ČR)
- rozpouštědla
 - metanol (Fisher Chemical, UK)
 - acetonitril (Fisher Chemical, UK)
 - superčistá voda – připravena pomocí přístroje Milli-Q RG (Merck Millipore, Massachusetts, USA)

4.1.2 Přístroje

- pumpa ESA model 582 (ESA, Massachusetts, USA)
- coulometrický detektor Coulochem III (ESA, Massachusetts, USA)
- monolitická HPLC kolona Onyx C8 – 100 × 4,6 mm (Phenomenex, Kalifornie, USA)
- analytické váhy Kern ALT 220-4NM (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)
- vortex mixér IKA® Vortex Genius 3 (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Německo)

4.1.3 Pomůcky

- mikrostříkačka – 50 µL (Hamilton Company, Nevada, USA)
- automatické jednobřávkové pipety – 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl (Brand, Německo)
- mikrozkušavky – 1,5 ml (Eppendorf, Německo)
- špičky k pipetám o objemu 200 µl, 1000 µl a 5 ml (Eppendorf, Německo)
- zkumavky centrifugační – 15 ml a 50 ml (Brand, Německo)

4.2 Metodický postup

4.2.1 Příprava zásobních roztoků

- Roztok železitých iontů (Fe^{3+})

5mM roztok Fe^{3+} byl připravený rozpuštěním příslušného množství chloridu železitého (FeCl_3 , $M_w = 162,2 \text{ g/mol}$) v ultračisté vodě.

- Roztok pufru o pH 4,5

Roztok pufru o pH 4,5 byl připravený smísením vodných roztoků octanu sodného a kyseliny octové. Konkrétně tento acetátový pufr obsahoval 15mM roztok octanu sodného a 27,3mM roztok kyseliny octové.

- Roztok pufru o pH 7,5

5mM TRIS byl připravený rozpuštěním příslušného množství TRIS ve vodě.

- Zásobní 5mM roztoky testovaných látek

Zásobní roztoky testovaných kyselin byly připraveny rozpuštěním příslušného množství dané kyseliny v metanolu. Následně byly před experimentem naředěny v metanolu na požadované koncentrace.

- Zásobní 66,67mM roztok kyseliny salicylové

Zásobní roztok byl připravený rozpuštěním příslušného množství kyseliny salicylové v metanolu.

- Zásobní 10mM roztoky standardů

Zásobní roztoky standardů (katechol, kyselina 2,3-dihydroxybenzoová a kyselina 2,5-dihydroxybenzoová) byly připraveny rozpuštěním příslušného množství jednotlivých standardů ve vodě.

4.2.2 Příprava pracovních roztoků

- Příprava standardů

Standardy byly připraveny v mikrozkuhavce smísením 27 μl 10 μM roztoku katecholu, 130 μl 1 μM roztoku 2,3-DHBA, 130 μl 1 μM roztoku 2,5-DHBA a 713 μl vody.

- Příprava kontrolních vzorků

Kontrolní vzorky byly připraveny v mikrozkušavce smísením 700 μl pufru (pH 4,5 nebo 7,5), 200 μl metanolu, 50 μl 1mM Fe^{3+} , 45 μl 66,67mM kyseliny salicylové v metanolu a 5 μl peroxidu vodíku.

- Příprava vzorků testovaných látek

Vzorky byly připraveny smísením 700 μl pufru (pH 4,5 nebo 7,5), 200 μl roztoku testované látky o různé koncentraci, 50 μl 1mM Fe^{3+} , 45 μl 66,67mM kyseliny salicylové v metanolu a 5 μl peroxidu vodíku.

Roztoky testovaných látek k přípravě vzorků byly připraveny zředěním 5mM zásobního roztoku příslušné kyseliny s potřebným množstvím metanolu na výsledné koncentrace 1,25 μM , 2,5 μM , 12,5 μM , 125 μM , 250 μM , 500 μM , 2,5 mM a 5 mM.

4.2.3 Příprava mobilní fáze

- Příprava 5mM H_3PO_4 pufru

V kádince se smísilo 68 μl 85% kyseliny fosforečné a 199,932 ml vody. Přidalo se 10 ml 20mM EDTA ve vodě. Následně se pomocí triethylaminu nastavilo pH roztoku na 2,85. Takto vytvořený pufr se přefiltroval pomocí aparatury pro vakuovou filtraci.

- Příprava samotné mobilní fáze

V odměrné baňce se smísil připravený H_3PO_4 pufr s acetonitrilem v poměru 93:7. Poté se vytvořená mobilní fáze ponechala 5 minut v ultrazvukové lázni.

4.2.4 Provedení experimentu

1. HPLC přístroj byl nastavený v izokratickém režimu s průtokovou rychlostí 1,0 ml/min.
2. Testované látky se v mikrozkušavce naředily v metanolu na tyto koncentrace: 1,25 μM , 2,5 μM , 12,5 μM , 125 μM , 250 μM , 500 μM , 2,5 mM a 5 mM.
3. V mikrozkušavce se připravila směs standardů ve vodě, která obsahovala 27 μl 10 μM roztoku katecholu, 130 μl 1 μM roztoku 2,3-DHBA, 130 μl 1 μM 2,5-DHBA a 713 μl vody.

4. Následně se pomocí Hamiltonové mikrostríkačky aplikovalo 20 μl připravené směsi do HPLC přístroje a změřila se plocha píků standardů o známé koncentraci.
5. Krok 3 a 4 byl zopakován třikrát. Výsledné hodnoty plochy píků se zprůměrovaly.
6. Připravily se kontrolní vzorky, které byly složené z 700 μl pufru o pH 4,5 nebo 7,5; 200 μl metanolu, 50 μl 1mM Fe^{3+} iontů, 45 μl 66,67mM kyseliny salicylové a 5 μl 30% peroxidu vodíku.
7. Po přidání peroxidu vodíku ke směsi se spustila Fentonova reakce. Za stálého míchání při laboratorní teplotě se nechala běžet 3 minuty.
8. Následovala HPLC analýza. Pomocí Hamiltonové stríkačky bylo aplikováno 20 μl připravené směsi do HPLC přístroje. Změřila se plocha vznikajících analytů, kterými byly katechol, kyselina 2,3-dihydroxybenzoová a kyselina 2,5-dihydroxybenzoová.
9. Kroky 6 až 8 byly zopakovány čtyřikrát. Z výsledných hodnot byl vypočítán jejich průměr.
10. V mikrozkušavkách byly připraveny roztoky vzorků, které byly složením podobné kontrolním vzorkům. Rozdíl spočíval ve výměně metanolu za roztoky testovaných látek v metanolu v různých koncentracích. Testované vzorky se tedy skládaly z: 700 μl pufru o pH 4,5 nebo 7,5; 200 μl roztoku testované látky s příslušnou koncentrací, 50 μl 1mM Fe^{3+} iontů, 45 μl 66,67mM kyseliny salicylové a 5 μl 30% peroxidu vodíku.
11. Opět se nechala proběhnout Fentonova reakce po dobu 3 minut. Po proběhnutí reakce se pomocí Hamiltonové stríkačky aplikovalo 20 μl směsi do HPLC přístroje k analýze. Změřilo se množství vznikajících analytů.
12. Krok 10 a 11 byl zopakován třikrát u všech koncentrací všech testovaných propionových kyselin. Výsledné hodnoty byly zprůměrovány.
13. Nakonec byly z výsledných hodnot vytvořeny grafy pro jednotlivé testované sloučeniny s určením, které metabolity flavonoidů a v jaké koncentraci mají antioxidační, případně pro-oxidační vlastnosti.

4.3 Matematické a statistické vyhodnocení

Procenta snížení (antioxidační účinek) anebo zvýšení (pro-oxidační účinek) produkce hydroxylových radikálů byla vypočítána ze součtu koncentrací katecholu, 2,3-DHBA a 2,5-DHBA mezi testovaným vzorkem a kontrolním vzorkem, který obsahoval namísto testované sloučeniny jen rozpouštědlo.

Výsledky jsou prezentovány jako průměr \pm směrodatná odchylka vypočítané podle

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

Statistické porovnání produkce hydroxylových radikálů bylo provedeno použitím testu ANOVA následovaného Dunnettovým post-hoc testem.

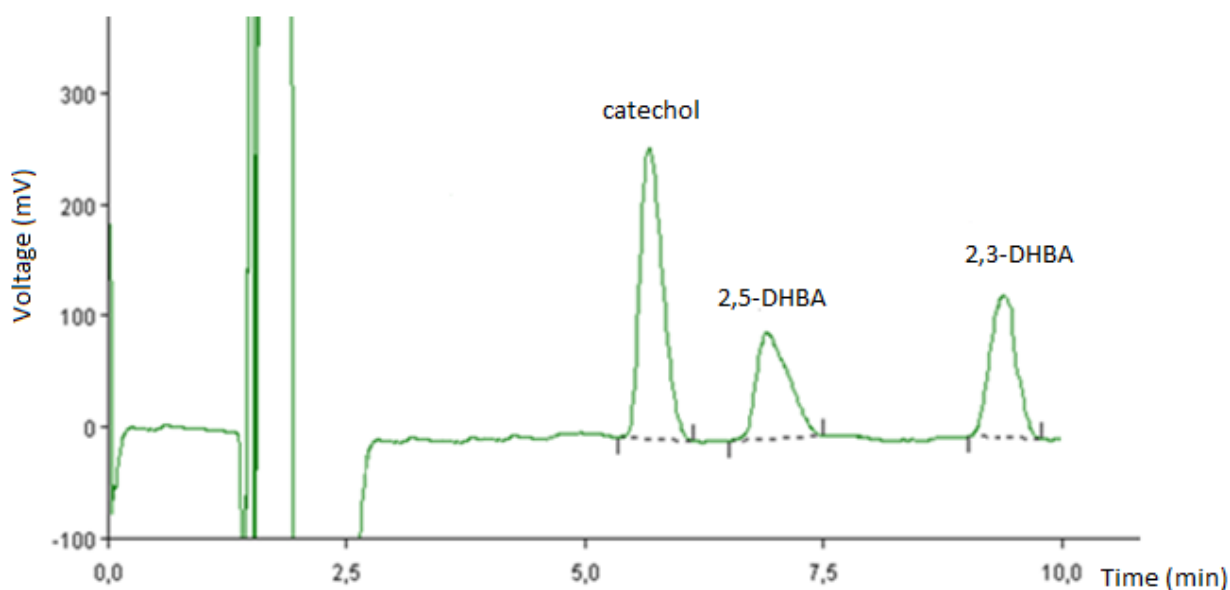
Grafické a statistické zpracování bylo provedeno pomocí programu GraphPad Prism verze 10.0 pro Windows (GraphPad Software, USA).

5. VÝSLEDKY

Výsledné grafy zobrazují vliv jednotlivých testovaných propionových kyselin na železem katalyzovanou Fentonovu reakci při dvou hodnotách pH, imitujících různé prostředí v organismu. Hodnota pH 4,5 může imitovat kyselé prostředí v žaludku a v horní části tenkého střeva, stejně tak jako pH lyzozomů a patologicky snížené pH při ischemii a u nádorů. Naopak hodnota pH 7,5 je blízká fyziologické hodnotě [65].

V grafech můžeme pozorovat změny procentuální produkce hydroxylových radikálů oproti kontrolním vzorkům. Posun do záporných hodnot na grafu značí snížení produkce hydroxylových radikálů neboli antioxidační účinek testované látky. Oproti tomu posun do kladných hodnot znamená zvýšení produkce volných radikálů, a tedy pro-oxidační vlastnosti.

Na Obr. 25 je znázorněn výsledek HPLC analýzy standardů. Tyto sloučeniny vznikaly po proběhnutí Fentonovy reakce v různých poměrech v testovaných vzorcích.



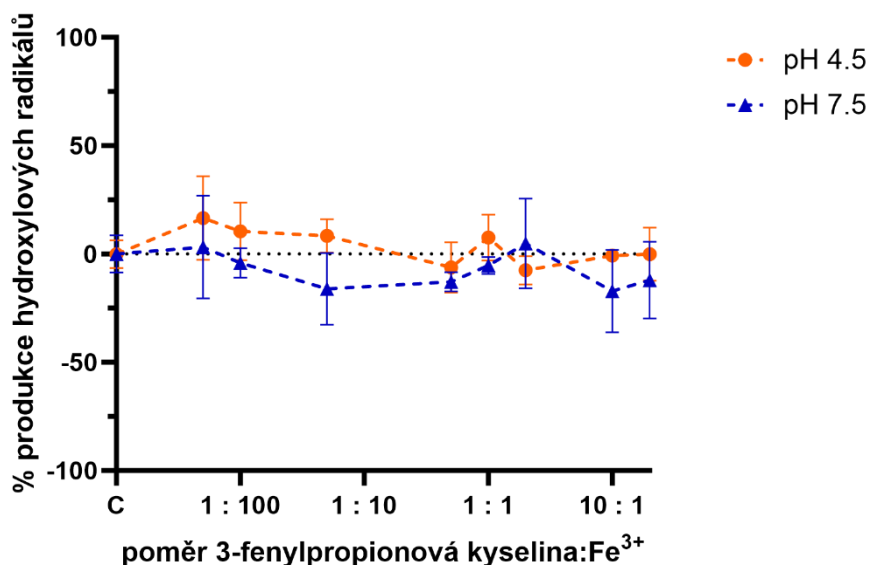
Obr. 25: Výsledek HPLC analýzy standardů.

2,5-DHBA: 2,5-dihydroxybenzoová kyselina; 2,3-DHBA: 2,3-dihydroxybenzoová kyselina

5.1 Vliv testovaných látek na železem katalyzovanou Fentonovu reakci

5.1.1 Vliv 3-fenylpropionové kyseliny

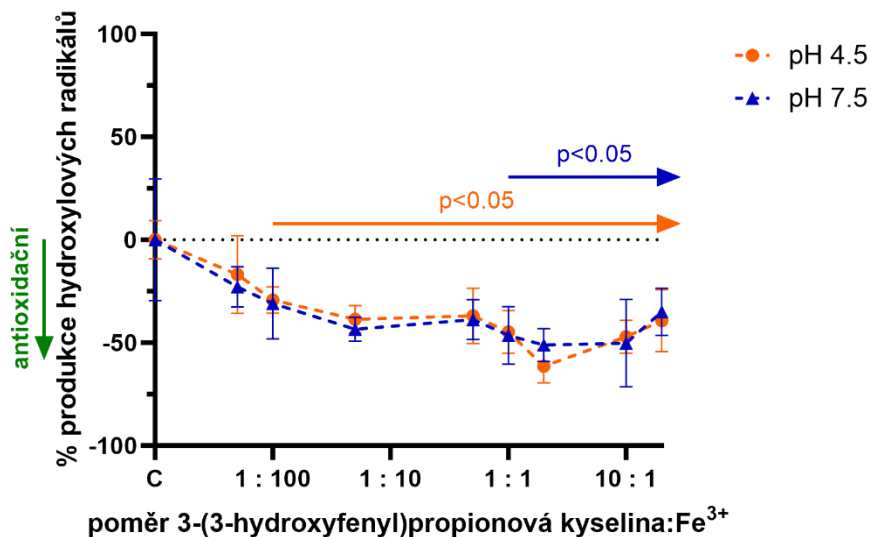
Kyselina 3-fenylpropionová nevykázala antioxidační ani pro-oxidační vlastnosti. Z grafu nejsou patrné žádné statisticky významné rozdíly v tvorbě hydroxylových radikálů. Sloučenina má tedy neutrální vliv na železem katalyzovanou Fentonovu reakci.



Obr. 26: Grafické znázornění vlivu 3-fenylpropionové kyseliny na železem katalyzovanou Fentonovu reakci při pH 4,5 a 7,5.

5.1.2 Vliv 3-(3-hydroxyfenyl)propionové kyseliny

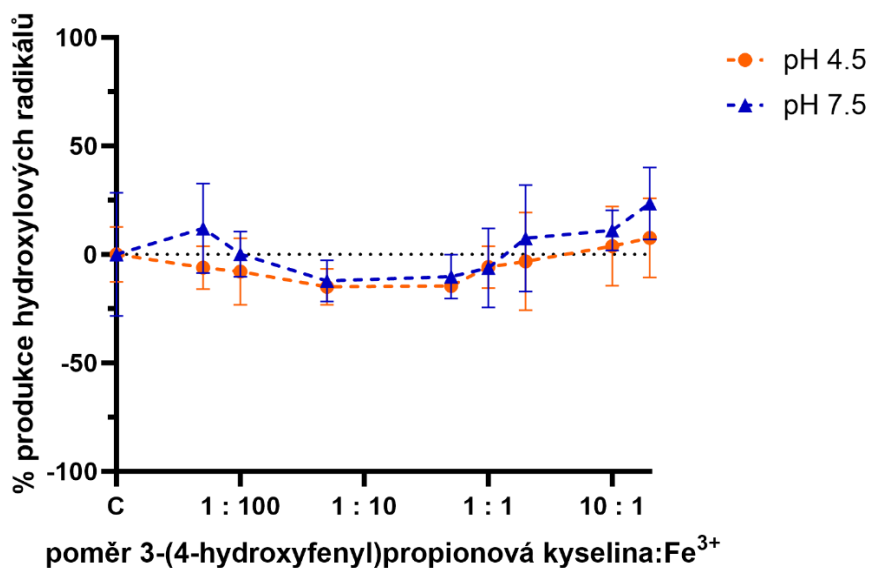
Z grafu je patrné, že kyselina 3-(3-hydroxyfenyl)propionová má výrazné antioxidační účinky. Pozorujeme, že statisticky významný pokles produkce hydroxylových radikálů nastává v obou pH, přičemž výrazněji se tomu děje v kyselejších prostředích (pokles produkce volných radikálů již od poměru koncentrací 1:100, kyselina:železité ionty).



Obr. 27: Grafické znázornění vlivu 3-(3-hydroxyfenyl)propionové kyseliny na železem katalyzovanou Fentonovu reakci při pH 4,5 a 7,5.

5.1.3 Vliv 3-(4-hydroxyfenyl)propionové kyseliny

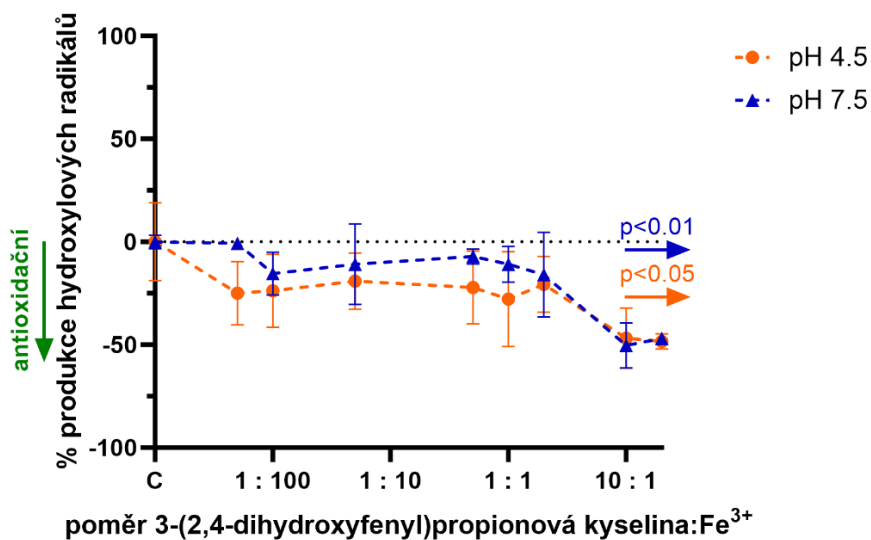
Kyselina 3-(4-hydroxyfenyl)propionová neprokázala statisticky významné změny v produkci volných hydroxylových radikálů v žádném z měřených hodnot pH. Její vliv na železem katalyzovanou Fentonovu reakci je proto neutrální.



Obr. 28: Grafické znázornění vlivu 3-(4-hydroxyfenyl)propionové kyseliny na železem katalyzovanou Fentonovu reakci při pH 4,5 a 7,5.

5.1.4 Vliv 3-(2,4-dihydroxyfenyl)propionové kyseliny

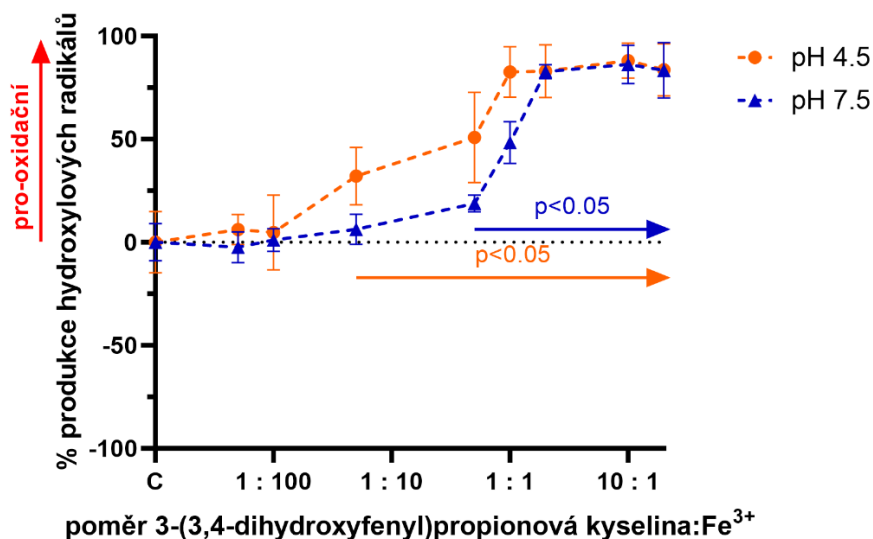
V případě kyseliny 3-(2,4-dihydroxyfenyl)propionové se prokázal její antioxidační efekt, ale pouze při vysokých koncentracích. Statisticky významné rozdíly v produkci hydroxylových radikálů pozorujeme při koncentračních poměrech 10:1 a 20:1, kyselina:železité ionty, v obou hodnotách pH.



Obr. 29: Grafické znázornění vlivu 3-(2,4-dihydroxyfenyl)propionové kyseliny na železem katalyzovanou Fentonovu reakci při pH 4,5 a 7,5.

5.1.5 Vliv 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionové kyseliny

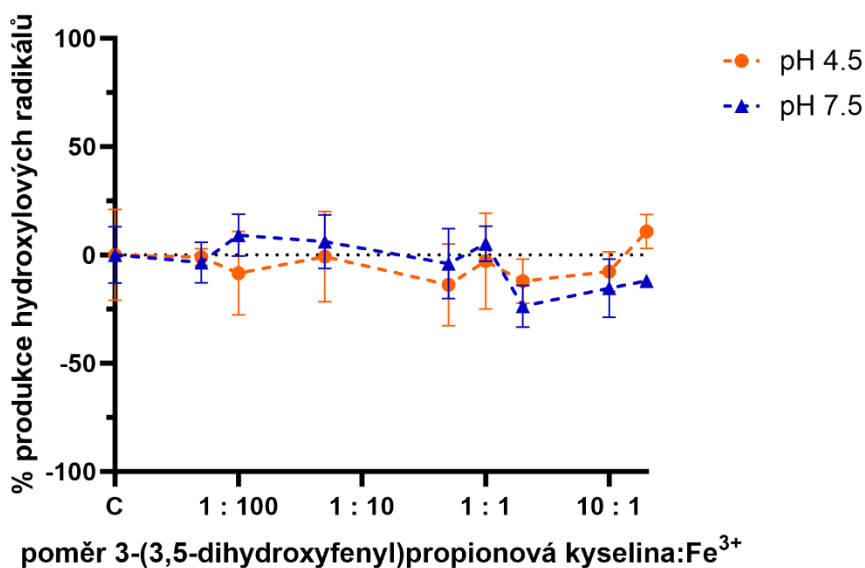
Kyselina 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina se ukázala jako výrazně pro-oxidační. Z grafu je patrný statisticky významný nárůst v produkci hydroxylových radikálů, při měření v obou pH. Pozorujeme tím vyšší pro-oxidační vlastnosti, čím vyšší je koncentrace kyseliny ve vzorku.



Obr. 30: Grafické znázornění vlivu 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionové kyseliny na železem katalyzovanou Fentonovu reakci při pH 4,5 a 7,5.

5.1.6 Vliv 3-(3,5-dihydroxyfenyl)propionové kyseliny

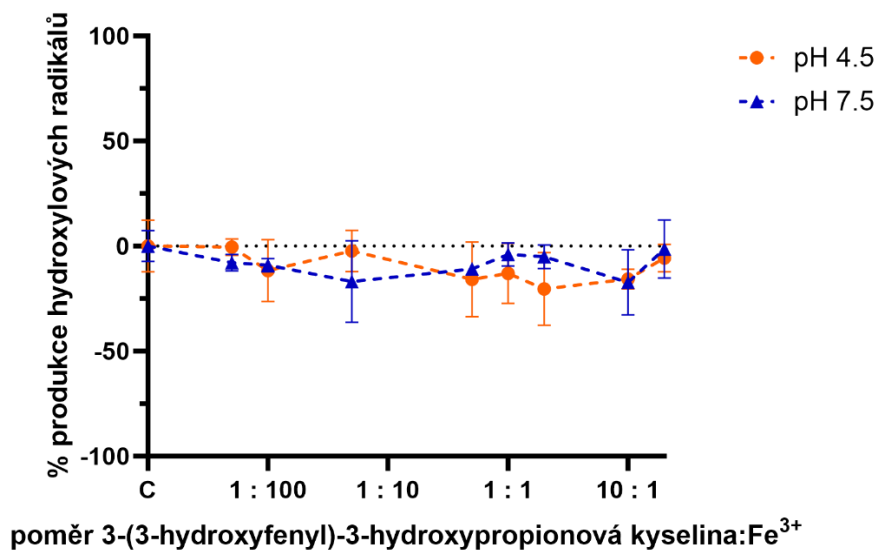
U této kyseliny nebyl prokázán ani antioxidační ani pro-oxidační účinek. Při vyhodnocování nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v žádné z měřených koncentrací, v obou pH.



Obr. 31: Grafické znázornění vlivu 3-(3,5-dihydroxyfenyl)propionové kyseliny na železem katalyzovanou Fentonovu reakci při pH 4,5 a 7,5.

5.1.7 Vliv 3-(3-hydroxyfenyl)-3-hydroxypropionové kyseliny

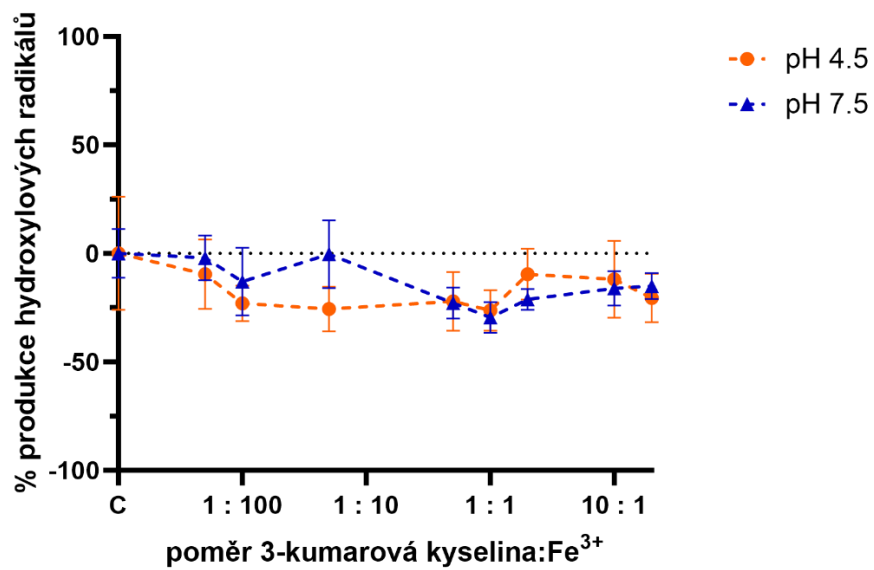
Ani v případě této kyseliny nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v tvorbě volných radikálů. Kyselina 3-(3-hydroxyfenyl)-3-hydroxypropionová má na jejich tvorbu neutrální vliv.



Obr. 32: Grafické znázornění vlivu 3-(3-hydroxyfenyl)-3-hydroxypropionové kyseliny na železem katalyzovanou Fentonovu reakci při pH 4,5 a 7,5.

5.1.8 Vliv 3-kumarové kyseliny

Poslední testovanou látkou byla kyselina 3-kumarová, která prokázala neutrální vliv na produkci hydroxylových radikálů. V žádné z testovaných koncentrací v obou pH se neukázaly statisticky významné rozdíly.



Obr. 33: Grafické znázornění vlivu 3-kumarové kyseliny na železem katalyzovanou Fentonovu reakci při pH 4,5 a 7,5.

6. DISKUZE

Flavonoidy jsou sekundární rostlinné metabolity, mající polyfenolovou strukturu. Jako obsahové látky rostlin jsou přijímány v potravě, hojně se vyskytují například v ovoci, zelenině a rostlinných nápojích. Jsou spojovány s řadou zdraví příznivých účinků, jako jsou protizánětlivé, protinádorové nebo kardioprotektivní vlastnosti [29, 32]. Mnoho epidemiologických studií naznačuje souvislost mezi dlouhodobým příjmem flavonoidů a sníženým rizikem kardiovaskulárních a neurodegenerativních onemocnění. Tento ochranný účinek lze přisuzovat jejich antioxidační aktivitě a schopnosti vychytávat volné radikály. Jsou to nejvíce zastoupené antioxidanty v běžné stravě. Antioxidační působení může být vysvětleno několika mechanismy: přímé vychytávání ROS, inhibice tvorby ROS prostřednictvím chelatace kovů, interakce s různými antioxidačními enzymy nebo inhibice radikálotvorných enzymů [27, 29, 45].

Bylo však prokázáno, že flavonoidy mohou mít za určitých podmínek i pro-oxidační účinky. Během Fentonovy reakce dochází ke vzniku hydroxylového radikálu z peroxidu vodíku za současné oxidace železnatých iontů na železitě. Zpětnou redukci Fe^{3+} na Fe^{2+} zapříčiněnou flavonoidy nebo jinými redukujícími látkami by tedy mohlo dojít k navýšení množství katalyzátoru a zintenzivnění Fentonovy reakce. Nicméně ve zdravém organismu se ionty kovů vyskytují převážně ve vázané formě a nejsou tak schopny katalyzovat reakce volných radikálů. Při poškození tkání, například při ateroskleróze, se však mohou uvolňovat a podporovat oxidační stres [46, 65].

Mnoho aktivit flavonoidů bylo stanoveno pomocí *in vitro* nebo *ex vivo* metod. V těchto testech se však nezohledňuje jejich biologická dostupnost a biotransformace v lidském těle [27]. Z celkového přijatého množství flavonoidů se do krevního řečiště dostane jen velmi malé množství, naopak rozsáhlá většina je metabolizována střevními bakteriemi za vzniku malých fenolických molekul. Bylo zjištěno, že mikroorganismy v tlustém střevě mají klíčovou úlohu při přeměně flavonoidů na fenolické kyseliny. Tyto metabolity se následně mohou vstřebávat, a tedy mohou mít potenciální biologické účinky [39, 42].

Cílem této diplomové práce bylo stanovit vliv propionových kyselin, které vznikají právě jako metabolity v průběhu degradace flavonoidů ve střevech, na vychytávání

volných radikálů a určit tak jejich antioxidační nebo pro-oxidační vlastnosti. Pro průběh experimentu byl zvolen model Fentonovy reakce, při které vznikají hydroxylové radikály. Vzniklý radikál může být zachycen kyselinou salicylovou, která podléhá hydroxylaci s následným vznikem tří reakčních produktů: katechol, 2,3-DHBA a 2,5-DHBA. Tyto produkty lze následně detekovat pomocí HPLC [65, 66].

Zjistilo se, že dvě z testovaných látek prokázaly antioxidační vlastnosti a byly schopny snížit množství vznikajících hydroxylových radikálů. Konkrétně se jednalo o kyselinu 3-(3-hydroxyfenyl)propionovou a kyselinu 3-(2,4-dihydroxyfenyl)propionovou, přičemž kyselina 3-(3-hydroxyfenyl)propionová byla o něco aktivnější. Při pH 4,5 výrazně snížila množství vznikajících hydroxylových radikálů již od koncentračního poměru 1:100 (kyselina:železité ionty). Oproti tomu pouze 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina vykázala pro-oxidační účinek a zvýšila množství vznikajících radikálů při obou testovaných hodnotách pH.

Na základě výsledků našeho měření můžeme usoudit, že k tomu, aby látky vykazovaly antioxidační nebo pro-oxidační účinky, je nutná přítomnost alespoň jedné hydroxy skupiny na benzenovém jádře, neboť 3-fenylpropionová kyselina, která obsahuje nehydroxylované aromatické jádro byla neutrální při obou hodnotách pH. K stejnému výsledku došli v práci od Chen *et al.* (2020), kde byla testována antioxidační aktivita kolonických metabolitů katechinu a epikatechinu pomocí několika testů, a to metodou založenou na vylučování stabilního volného radikálu 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylu (DPPH[•]), metodou fungující na principu zhášení radikálu ABTS^{•+} (2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát) a metodou FRAP (ferric reducing antioxidant power), která je založena na principu redoxní reakce. Ať už kyselina benzoová, fenylactová, tak také fenylpropionová, které nemají hydroxy skupinu na benzenovém kruhu, nevykázaly antioxidační účinek ani v jedné z testovaných metod [67]. K podobnému závěru dospěli také v studii od Sroka *et al.* (2003), v které testovali schopnost několika fenolických kyselin vylučovat volné radikály. Závěrem této práce bylo, že antioxidační aktivita pozitivně koreluje s počtem hydroxylových skupin navázaných na aromatický kruh [68]. S tímto závěrem můžeme souhlasit, ale jen částečně. Ačkoliv se udává, že počet hydroxy skupin v molekule fenolických kyselin zvyšuje jejich antioxidační aktivitu, tak v případě našeho experimentu to potvrzeno

nebylo. Jako příklad lze uvést, že kyseliny s dvěma OH skupinami, lišící se polohou substituce na fenylovém zbytku, vykazovaly rozdílné výsledky: kyselina 3-(2,4-dihydroxyfenyl)propionová se ukázala jako antioxidační, kyselina 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová se ukázala jako pro-oxidační a kyselina 3-(3,5-dihydroxyfenyl)propionová měla neutrální vliv na Fentonovu reakci.

Zdá se tedy, že pro antioxidační účinek je daleko důležitější umístění substituce hydroxylových skupin na aromatickém jádře než jejich celkový počet. V našem testu vyšla jako nejúčinnější antioxidant kyselina 3-(3-hydroxyfenyl)propionová, která má hydroxylovou skupinu umístěnou v poloze *meta*. To je v souladu se studií od Mansouri *et al.* (2005), která zkoumala aktivitu benzoových a skořicových kyselin a jejich hydroxylovaných derivátů při vychytávání peroxidu vodíku. Ten je sice biologicky významná neradikálová sloučenina, která může vznikat v tkáních oxidačními procesy, ale také se může přeměnit na vysoce reaktivní hydroxylový radikál, při katalýze ionty přechodných kovů [69]. Pokud byla substituce hydroxylové skupiny posunuta do polohy *para*, jako je tomu u 3-(4-hydroxyfenyl)propionové kyseliny, došlo k úplnému vymizení antioxidačního působení a výsledek byl neutrální.

S výsledky práce od Mansouri *et al.* (2005) se shodujeme i v tom, že nenasycenost postranního řetězce negativně ovlivňuje schopnost vychytávat volné radikály [69]. Zatímco kyselina 3-(3-hydroxyfenyl)propionová ukázala nejvyšší snížení produkce hydroxylových radikálů, tak v případě kyseliny 3-kumarové, která se liší právě přítomností dvojně vazby v postranním řetězci, bylo působení neutrální. Stejně tak měla na účinek negativní vliv hydroxylace postranního řetězce, jako je tomu u 3-(3-hydroxyfenyl)-3-hydroxypropionové kyseliny, kde bylo působení také neutrální.

Antioxidační aktivitu lze zkoumat na základě různých testů, jejichž výsledky se nemusí shodovat. Z toho vyplývá, že antioxidační vlastnosti se mohou lišit v závislosti na použité metodě a podmínkách [70]. Například kyselina 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová je na základě několika studií označována jako antioxidační látka, ačkoliv v našem experimentu ukázala pro-oxidační vliv. Studie provedená Silvou *et al.* (2000) dokonce prokázala vyšší antiradikálový účinek než u tokoferolu, který byl použit jako referenční látka při měření DPPH• metodou [71]. Stejně tak výzkum Zhou *et al.* (2014) založený na metodě ABTS•⁺ prokázal kyselinu

3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionovou jako antioxidační [72]. Zde je ale nutné zmínit, že biologická relevance použitých syntetických stabilních radikálů (DPPH• a ABTS•+) není jasná a studie, které je používají můžou změřit jen antioxidační, ale ne pro-oxidační účinky. To by vysvětlovalo i závěr experimentu publikovaného Siquetem *et al.* (2005), který se zaměřil na stanovení pro-oxidačního chování polyfenolických látek při oxidaci 2'-deoxyguanosinu Fentonovou reakcí za nepřítomnosti kyseliny askorbové. Ze získaných výsledků vyplynulo, že sloučeniny obsahující *ortho*-dihydroxy uspořádání mají vyšší pro-oxidační aktivitu než pyrogallolové sloučeniny. Pro-oxidační účinek se dal očekávat vždy, když se na tvorbě škodlivých radikálů podílely přechodné kovy spolu s katecholovou skupinou ve struktuře testovaného polyfenolu. Zdá se tedy, že katecholová struktura hraje důležitou roli v redukční schopnosti látek vůči železitým iontům [73]. A to současně odpovídá našim výsledkům měření, kde kyselina 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová, která má jako jediná ve své struktuře *ortho*-dihydroxy skupinu, měla zároveň jako jediná pro-oxidační účinek při železitémi ionty spouštěné Fentonově reakci.

Celkově je možné uvést, že počet hydroxylových skupin navázaných na aromatický kruh a jejich poloha jsou pravděpodobně nejdůležitějšími, nikoli však jedinými faktory ovlivňujícími antioxidační a pro-oxidační účinky fenolických kyselin. Zároveň je limitací naší studie *in vitro* metoda, která sice používá biologicky relevantní Fentonovu reakci, ale v reálných podmínkách lidského těla můžou být účinky zkoumaných látek ovlivněné například přítomností jiných antioxidantů.

7. ZÁVĚR

V této diplomové práci byl měřen vliv osmi propionových kyselin na produkci hydroxylových radikálů z Fentonovy reakce. Jako katalyzátor byly vybrány železité ionty a měření probíhalo ve dvou (pato)fyziologicky významných hodnotách pH.

Dvě testované látky prokázaly antioxidační vlastnosti, konkrétně 3-(3-hydroxyfenyl)propionová kyselina a 3-(2,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina. Přičemž kyselina 3-(3-hydroxyfenyl)propionová se ukázala jako efektivnější při snížení tvorby volných radikálů (při pH 4,5 snižovala jejich tvorbu již od koncentračního poměru 1:100 a při pH 7,5 od poměru koncentrací 1:1) oproti kyselině 3-(2,4-dihydroxyfenyl)propionové, která své antioxidační vlastnosti projevila až v násobně vyšší koncentraci (v obou hodnotách pH od koncentračního poměru 10:1, kyselina:železité ionty).

Naopak kyselina 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová se ukázala jako výrazně pro-oxidační látka, tedy látka zvyšující tvorbu hydroxylových radikálů. Při měření v obou hodnotách pH vykazovala nárůst tvorby volných radikálů se zvyšující se koncentrací.

Ostatní testované kyseliny měly na železem katalyzovanou Fentonovu reakci neutrální vliv.

Měření probíhalo HPLC metodou, tedy v *in vitro* podmínkách. Chování látek v *in vivo* podmínkách může být odlišné a je tedy nutné v případě použití daných látek v klinické praxi nejdříve ověřit jak jejich účinnost, tak také možnou toxicitu.

8. SEZNAM ZKRATEK

2,3-DHBA	2,3-dihydroxybenzoová kyselina
2,5-DHBA	2,5-dihydroxybenzoová kyselina
4CL	4-kumarát-CoA-ligáza
ABC	ATP binding cassette, ABC transportér
ABTS ⁺ •	2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát
ADT	arogenát-dehydratáza
ANS	anthokyanidin syntáza
ATP	adenosintrifosfát
BCRP	protein rezistence vůči rakovině prsu
C4H	cinamát-4-hydroxyláza
CBG	cytosolová β -glukosidáza
CoA	koenzym A
COMT	katechol-O-metyltransferáza
CYP450	cytochrom P450
DFO	deferoxamin
DFP	deferipron
DFR	dihydroflavonol reduktáza
DFX	deferasirox
DMT1	divalent metal transporter 1
DPPH [•]	2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl
F3H	flavanon-3-hydroxyláza
FLS	flavonol syntáza
FNS	flavon syntáza
FPN	ferroportin

FRAP	ferric reducing antioxidant power
GPx	glutathionperoxidáza
HEPC	hepcidin
CHI	chalkon isomeráza
CHS	chalkon syntáza
IFS	isoflavonoid syntáza
IL-6	interleukin 6
LPH	laktáza-florizin hydroláza
MRP	protein multirezistence
PAL	fenylalanin amoniakální lyáza
P-gp	P-glykoprotein
PhAT	prefenát-aminotransferáza
RES	retikuloendotelový systém
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
SGLT1	sodík-dependentní glukózový transportér 1
SOD	superoxiddismutáza
SULT	sulfotransferáza
Tf	transferrin
TfR (1, 2)	transferrinový receptor (1, 2)
UGT	uridin-5'-difosfát glukuronyltransferáza

9. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Recyklace železa buňkami retikuloendotelového systému.	12
Obr. 2: Přeměna hemu na biliverdin, oxid uhelnatý a železnaté ionty.....	13
Obr. 3: Struktury chelátorů železa: deferoxamin, deferipron a deferasirox.....	19
Obr. 4: Základní chemické struktury: flavonoidy, isoflavonoidy, neoflavonoidy.....	20
Obr. 5: Chemická struktura flavonů.	21
Obr. 6: Chemická struktura flavanolů.	22
Obr. 7: Chemická struktura flavanonů.	23
Obr. 8: Chemická struktura flavanolů.	23
Obr. 9: Chemická struktura isoflavonů.	24
Obr. 10: Chemická struktura anthokyanidinů.	25
Obr. 11: Chemická struktura chalkonů.	25
Obr. 12: Shrnutí biosyntetických cest flavonoidů.	27
Obr. 13: Shrnutí biosyntézy flavonoidů.	28
Obr. 14: Potenciální místa biotransformace a štěpení kruhu flavonoidů.....	31
Obr. 15: Schéma metabolismu flavonoidů.....	32
Obr. 16: Vychytávání reaktivních forem kyslíku flavonoidy.....	33
Obr. 17: 3-fenylpropionová kyselina.....	35
Obr. 18: 3-(3-hydroxyfenyl)propionová kyselina.	35
Obr. 19: 3-(4-hydroxyfenyl)propionová kyselina.	36
Obr. 20: 3-(2,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina.	36
Obr. 21: 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina.	37
Obr. 22: 3-(3,5-dihydroxyfenyl)propionová kyselina.	37
Obr. 23: 3-(3-hydroxyfenyl)-3-hydroxypropionová kyselina.....	38
Obr. 24: 3-kumarová kyselina.	38
Obr. 25: Výsledek HPLC analýzy standardů.....	45
Obr. 26: Grafické znázornění vlivu 3-fenylpropionové kyseliny na železem katalyzovanou Fentonovu reakci při pH 4,5 a 7,5.	46
Obr. 27: Grafické znázornění vlivu 3-(3-hydroxyfenyl)propionové kyseliny na železem katalyzovanou Fentonovu reakci při pH 4,5 a 7,5.....	47
Obr. 28: Grafické znázornění vlivu 3-(4-hydroxyfenyl)propionové kyseliny na železem katalyzovanou Fentonovu reakci při pH 4,5 a 7,5.....	47
Obr. 29: Grafické znázornění vlivu 3-(2,4-dihydroxyfenyl)propionové kyseliny na železem katalyzovanou Fentonovu reakci při pH 4,5 a 7,5.....	48

Obr. 30: Grafické znázornění vlivu 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionové kyseliny na železem katalyzovanou Fentonovu reakci při pH 4,5 a 7,5.....	49
Obr. 31: Grafické znázornění vlivu 3-(3,5-dihydroxyfenyl)propionové kyseliny na železem katalyzovanou Fentonovu reakci při pH 4,5 a 7,5.....	49
Obr. 32: Grafické znázornění vlivu 3-(3-hydroxyfenyl)-3-hydroxypropionové kyseliny na železem katalyzovanou Fentonovu reakci při pH 4,5 a 7,5.....	50
Obr. 33: Grafické znázornění vlivu 3-kumarové kyseliny na železem katalyzovanou Fentonovu reakci při pH 4,5 a 7,5.	51

10. POUŽITÁ LITERATURA

1. National Library of Medicine. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, staženo 15. 10. 2023 a 14. 4. 2024.
2. ChemTalk. Dostupné z: <https://chemistrytalk.org/iron-element/>, staženo 15. 10. 2023.
3. Lieu P. T., Heiskala M., Peterson P. A., Yang Y.: The roles of iron in health and disease. *Molecular Aspects of Medicine* 22(1-2), 1-87 (2001).
4. Yiannikourides A., Latunde-Dada G.: A Short Review of iron metabolism and pathophysiology of iron disorders. *Medicines* 6(3), 85 (2019).
5. Abbaspour N., Hurrell R., Kelishadi R.: Review on iron and its importance for human health. *Journal of Research in Medical Sciences* 19(2), 164-174 (2014).
6. Waldvogel-Abramowski S., Waeber G., Gassner C., Buser A., Frey B. M., Favrat B., Tissot J. D.: Physiology of iron metabolism. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 41(3), 213-221 (2014).
7. Knutson M., Wessling-Resnick M.: Iron metabolism in the reticuloendothelial systém. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 38(1), 61-88 (2003).
8. Dutt S., Hamza I., Bartnikas T. B.: Molecular mechanisms of iron and heme metabolism. *Annual Review of Nutrition* 42, 311-335 (2022).
9. Mladěnka P., Hrdina R., Hübl M., Šimůnek T.: The fate of iron in the organism and its regulatory pathways. *Acta medica (Hradec Králové)* 48(3-4), 127–135 (2005).
10. Doguer C., Ha J. H., Collins J. F.: Intersection of iron and copper metabolism in the mammalian intestine and liver. *Comprehensive Physiology* 8(4), 1433-1461 (2018).
11. Anderson G. J., Frazer D. M., McLaren G. D.: Iron absorption and metabolism. *Current Opinion in Gastroenterology* 25(2), 129-135 (2009).

12. Aisen P., Enns C., Wessling-Resnick M.: Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 33(10), 940-959 (2001).
13. Gurzau E. S., Neagu C., Gurzau A. E.: Essential metals – Case study on iron. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56(1), 190-200 (2003).
14. Jomova K., Valko M.: Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 283(2-3), 65-87 (2011).
15. Gattermann N., Muckenthaler M. U., Kulozik A. E., Metzgeroth G., Hastka J.: Investigation of iron deficiency and iron overload. *Deutsches Ärzteblatt International* 118(49), 847-856 (2021).
16. Ďuračková Z.: Some current insights into oxidative stress. *Physiological Research* 59(4), 459-469 (2010).
17. Catapano M. C., Protti M., Fontana T., Mandrioli R., Mladěnka P., Mercolini L.: An original HPLC method with coulometric detection to monitor hydroxyl radical generation via Fenton chemistry. *Molecules* 24(17), 3066 (2019).
18. Trembl J., Šmejkal K.: Flavonoids as potent scavengers of hydroxyl radicals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 15(4), 720-738 (2016).
19. Winterbourn C. C.: Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicology Letters* 82/83, 969-974 (1995).
20. Mladěnka P., Šimůnek T., Hübl M., Hrdina R.: The role of reactive oxygen and nitrogen species in cellular iron metabolism. *Free Radical Research* 40(3), 263-272 (2006).
21. Pham-Huy L. A., He H., Pham-Huy C.: Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science* 4(2), 89-96 (2008).
22. Entezari S., Haghi S. M., Norouzkhani N., Sahebazar B., Vosoughian F., Akbarzadeh D., Islampanah M., Naghs N., Abbasalizadeh M., Deravi N.: Iron chelators in treatment of iron overload. *Journal of Toxicology* 2022, 4911205 (2022).

23. Ding X., Xie H., Kang Y. J.: The significance of copper chelators in clinical and experimental application. *Journal of Nutritional Biochemistry* 22(4), 301-310 (2011).
24. Poggiali E., Cassinerio E., Zanaboni L., Cappellini M. D.: An update on iron chelation therapy. *Blood Transfusion* 10(4), 411-422 (2012).
25. Kwok J. C., Richardson D. R.: The cardioprotective effect of the iron chelator dexrazoxane (ICRF-187) on anthracycline-mediated cardiotoxicity. *Redox Report* 5(6), 317-324 (2000).
26. Panche A. N., Diwan A. D., Chandra S. R.: Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science* 5(47), 1-15 (2016).
27. Viskupičová J., Ondrejovič M.: Bioavailability and metabolism of flavonoids. *Journal of Food and Nutrition Research* 47(4), 151-162 (2008).
28. Ullah A., Munir S., Badshah S. L., Khan N., Ghani L., Poulson B. G., Emwas A. H., Jaremko M.: Important flavonoids and their role as a therapeutic agent. *Molecules* 25(22), 5243 (2020).
29. Dias M. C., Pinto D. C. G. A., Silva A. M. S.: Plant flavonoids: chemical characteristics and biological activity. *Molecules* 26(17), 5377 (2021).
30. Kozłowska A., Szostak-Węgierek D.: Targeting cardiovascular diseases by flavonols: an update. *Nutrients* 14(7), 1439 (2022).
31. Shen N., Wang T., Gan Q., Liu S., Wang L., Jin B.: Plant flavonoids: classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. *Food Chemistry* 383, 132531 (2022).
32. Guven H., Arici A., Simsek O.: Flavonoids in our foods: a short review. *Journal of Basic and Clinical Health Sciences* 3(2), 96-106 (2019).
33. Rudrapal M., Khan J., Dukhyil A. A. B., Alarousy R. M. I. I., Attah E. I., Sharma T., Khairnar S. J., Bendale A. R.: Chalcone scaffolds, bioprecursors of flavonoids: chemistry, bioactivities, and pharmacokinetics. *Molecules* 26(23), 7177 (2021).

34. Marinova K., Kleinschmidt K., Weissenböck G., Klein M.: Flavonoid biosynthesis in barley primary leaves requires the presence of the vacuole and controls the activity of vacuolar flavonoid transport. *Plant Physiology* 144(1), 432-444 (2007).
35. Liga S., Paul C., Péter F.: Flavonoids: overview of biosynthesis, biological activity, and current extraction techniques. *Plants* 12(14), 2732 (2023).
36. Rehan M., v knize: *Bioactive compounds - biosynthesis, characterization and applications* (Zepka L. Q., do Nascimento T. C., Jacob-Lopes E.), kapitola Biosynthesis of diverse class flavonoids via shikimate and phenylpropanoid pathway (2021). Dostupné z: <https://www.intechopen.com/chapters/75392>, staženo 12. 3. 2024.
37. Liu W., Feng Y., Yu S., Fan Z., Li X., Li J., Yin H.: The flavonoid biosynthesis network in plants. *International Journal of Molecular Sciences* 22(23), 12824 (2021).
38. Shah A., Smith D. L.: Flavonoids in agriculture: chemistry and roles in, biotic and abiotic stress responses, and microbial associations. *Agronomy* 10(8), 1209 (2020).
39. Hollman P. C. H.: Absorption, bioavailability, and metabolism of flavonoids. *Pharmaceutical Biology* 42(1), 74-83 (2004).
40. Murota K., Nakamura Y., Uehara M.: Flavonoid metabolism: the interaction of metabolites and gut microbiota. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 82(4), 600-610 (2018).
41. Chen L., Cao H., Huang Q., Xiao J., Teng H.: Absorption, metabolism and bioavailability of flavonoids: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 62(28), 7730-7742 (2022).
42. Billowria K., Ali R., Rangra N. K., Kumar R., Chawla P. A.: Bioactive flavonoids: A comprehensive review on pharmacokinetics and analytical aspects. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 1-15 (2022).
43. Al-Ishaq R. K., Liskova A., Kubatka P., Büsselberg D.: Enzymatic metabolism of flavonoids by gut microbiota and its impact on gastrointestinal cancer. *Cancers* 13(16), 3934 (2021).

44. Pietta P. G.: Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products* 63(7), 1035-1042 (2000).
45. Mladěnka P., Zatloukalová L., Filipský T., Hrdina R.: Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radical Biology & Medicine* 49(6), 963-975 (2010).
46. Procházková D., Boušová I., Wilhelmová N.: Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* 82(4), 513-523 (2011).
47. Cherrak S. A., Mokhtari-Soulimane N., Berroukeche F., Bensenane B., Cherbonnel A., Merzouk H., Elhabiri M.: In vitro antioxidant versus metal ion chelating properties of flavonoids: A structure-activity investigation. *PLoS One* 11(10), 0165575 (2016).
48. Rechner A. R., Smith M. A., Kuhnle G., Gibson G. R., Debnam E. S., Srail S. K. S., Moore K. P., Rice-Evans C. A.: Colonic metabolism of dietary polyphenols: Influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radical Biology & Medicine* 36(2), 212-225 (2004).
49. Rechner A. R., Kuhnle G., Bremner P., Hubbard G. P., Moore K. P., Rice-Evans C. A.: The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radical Biology & Medicine* 33(2), 220-235 (2002).
50. Drugbank Online. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB02024>, staženo 14. 4. 2024.
51. Dobani S., Latimer C., McDougall G. J., Allwood J. W., Pereira-Caro G., Moreno-Rojas J. M., Ternan N. G., Pourshahidi L. K., Lawther R., Tuohy K. M., Del Rio D., O'Connor G., Rowland I., Almutairi T. M., Crozier A., Gill C. I. R.: Ex vivo fecal fermentation of human ileal fluid collected after raspberry consumption modifies (poly)phenolics and modulates genoprotective effects in colonic epithelial cells. *Redox Biology* 40, 101862 (2021).
52. Burlingame R., Chapman P. J.: Catabolism of phenylpropionic acid and its 3-hydroxy derivative by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 155(1), 113-121 (1983).

53. Najmanová I., Pourová J., Vopršalová M., Pilařová V., Semecký V., Nováková L., Mladěňka P.: Flavonoid metabolite 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid formed by human microflora decreases arterial blood pressure in rats. *Molecular Nutrition & Food Research* 60(5), 981-991 (2016).
54. Owen R. W., Haubner R., Mier W., Giacosa A., Hull W. E., Spiegelhalder B., Bartsch H.: Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. *Food and Chemical Toxicology* 41(5), 703-717 (2003).
55. Braune A., Blaut M.: Deglycosylation of puerarin and other aromatic C-glucosides by a newly isolated human intestinal bacterium. *Environmental Microbiology* 13(2), 482-494 (2011).
56. Serra A., Macià A., Romero M. P., Anglés N., Morelló J. R., Motilva M. J.: Metabolic pathways of the colonic metabolism of procyanidins (monomers and dimers) and alkaloids. *Food Chemistry* 126(3), 1127-1137 (2011).
57. Khatib S., Nerya O., Musa R., Tamir S., Peter T., Vaya J.: Enhanced substituted resorcinol hydrophobicity augments tyrosinase inhibition potency. *Journal of Medicinal Chemistry* 50(11), 2676-2681 (2007).
58. Serra A., Macià A., Romero M. P., Reguant J., Ortega N., Motilva M. J.: Metabolic pathways of the colonic metabolism of flavonoids (flavonols, flavones and flavanones) and phenolic acids. *Food Chemistry* 130(2), 383-393 (2012).
59. Zieniuk B.: Dihydrocaffeic acid—is it the less known but equally valuable phenolic acid? *Biomolecules* 13(5), 859 (2023).
60. Wang J., Hodes G. E., Zhang H., Zhang S., Zhao W., Golden S. A., Bi W., Menard C., Kana V., Leboeuf M., Xie M., Bregman D., Pfau M. L., Flanigan M. E., Esteban-Fernández A., Yemul S., Sharma A., Ho L., Dixon R., Merad M., Han M. H., Russo S. J., Pasinetti G. M.: Epigenetic modulation of inflammation and synaptic plasticity promotes resilience against stress in mice. *Nature Communications* 9(1), 477 (2018).

61. Guyman L. A., Adlercreutz H., Koskela A., Li L., Beresford S. A. A., Lampe J. W.: Urinary 3-(3,5-dihydroxyphenyl)-1-propanoic acid, an alkylresorcinol metabolite, is a potential biomarker of whole-grain intake in a U.S. population. *The Journal of Nutrition* 138(10), 1957-1962 (2008).
62. Zhao Y., Zhang X.: Interactions of tea polyphenols with intestinal microbiota and their implication for anti-obesity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 100(3), 897-903 (2020).
63. Xiong X., Liu D., Wang Y., Zeng T., Peng Y.: Urinary 3-(3-hydroxyphenyl)-3-hydroxypropionic acid, 3-hydroxyphenylacetic acid, and 3-hydroxyhippuric acid are elevated in children with autism spectrum disorders. *Biomed Research International* 2016, 9485412 (2016).
64. Roowi S., Stalmach A., Mullen W., Lean M. E. J., Edwards C. A., Crozier A.: Green tea flavan-3-ols: colonic degradation and urinary excretion of catabolites by humans. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 58(2), 1296-1304 (2010).
65. Macáková K., Mladěnka P., Filipský T., Říha M., Jahodář L., Trejtnar F., Bovicelli P., Silvestri I. P., Hrdina R., Saso L.: Iron reduction potentiates hydroxyl radical formation only in flavonols. *Food Chemistry* 135(4), 2584-2592 (2012).
66. Freinbichler W., Bianchi L., Colivicchi M. A., Ballini C., Tipton K. F., Linert W., Corte L. D.: The detection of hydroxyl radicals in vivo. *Journal of Inorganic Biochemistry* 102(5-6), 1329-1333 (2008).
67. Chen W., Zhu X., Lu Q., Zhang L., Wang X., Liu R.: C-ring cleavage metabolites of catechin and epicatechin enhanced antioxidant activities through intestinal microbiota. *Food Research International* 135(4), 109271 (2020).
68. Sroka Z., Cisowski W.: Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food and Chemical Toxicology* 41(6), 753-758 (2003).
69. Mansouri A., Makris D. P., Kefalas P.: Determination of hydrogen peroxide scavenging activity of cinnamic and benzoic acids employing a highly sensitive

peroxyoxalate chemiluminescence-based assay: structure-activity relationships. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 39(1-2), 22-26 (2005).

70. Moazzen A., Öztinen N., Ak-Sakalli E., Koşar M.: Structure-antiradical activity relationships of 25 natural antioxidant phenolic compounds from different classes. *Heliyon* 8(9), 10467 (2022).

71. Silva F. A. M., Borges F., Guimarães C., Lima J. L. F. C., Matos C., Reis S.: Phenolic acids and derivatives: studies on the relationship among structure, radical scavenging activity, and physicochemical parameters. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48(6), 2122-2126 (2000).

72. Zhou X., Zhou M., Liu Y., Ye Q., Gu J., Luo G.: Isolation and identification of antioxidant compounds from *Gynura bicolor* stems and leaves. *International Journal of Food Properties* 19(1), 233-241 (2016).

73. Siquet C., Paiva-Martins F., Lima J. L. F. C., Reis S., Borges F.: Antioxidant profile of dihydroxy- and trihydroxyphenolic acids – a structure-activity relationship study. *Free Radical Research* 40(4), 433-442 (2006).