

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY



## RIGORÓZNÍ PRÁCE

### Porovnání chelatace iontů mědi benzoovými kyselinami

Comparison of copper ion chelation by benzoic acids

Mgr. Eva Gorbunovová

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

HRADEC KRÁLOVÉ, 2018

1.	ABSTRAKT .....	6
2.	ABSTRACT.....	7
3.	ÚVOD.....	8
4.	CÍL PRÁCE.....	9
5.	TEORETICKÁ ČÁST.....	10
5.1	Stopové prvky.....	10
5.1.1	Měď.....	10
	Wilsonova choroba.....	12
	Menkesův syndrom .....	13
	Ostatní onemocnění způsobené poruchou homeostázy mědi.....	14
5.2	Sekundární metabolismus rostlin.....	15
5.2.1	Flavonoidy.....	16
	Antioxidační aktivita .....	19
	Antikarcinogenní účinky.....	20
	Protizánětlivé účinky .....	20
	Estrogenní aktivita.....	21
	Antimikrobiální aktivita.....	22
	Antidiabetická aktivita .....	23
	Další využití flavonoidů .....	23
	Kvercetin .....	24
	Katechiny.....	25
	Proanthokyanidiny .....	26
	Fenolové látky.....	27
5.2.2	Benzoová kyselina.....	27
5.2.3	3-hydroxybenzoová kyselina.....	28
5.2.4	4- hydroxybenzoová kyselina.....	29
5.2.5	3,4-dihydroxybenzoová kyselina.....	30
5.2.6	2,4-dihydroxybenzoová kyselina.....	31
5.2.7	2-hydroxy-4-methoxybenzoová kyselina.....	32
5.3	Metabolismus flavonoidů.....	33

6.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	36
6.1	Pomůcky .....	36
6.1.1	Materiál .....	36
6.1.2	Chemikálie .....	36
6.1.3	Přístrojové vybavení.....	37
6.2	Příprava roztoků .....	37
6.2.1	Příprava zásobních roztoků.....	37
6.2.2	Příprava pracovních roztoků .....	38
6.3	Všeobecné postupy.....	39
6.3.1	Kalibrační křivka.....	39
6.3.2	Zkouška základních roztoků iontů mědi.....	41
6.3.3	Stanovení chelatace iontů mědi <i>hematoxylinem</i> .....	41
6.3.4	Chelatace měďnatých ( $\text{Cu}^{2+}$ ) iontů v pufru (pH 4.5, 5.5, 6.8, 7.5) .....	43
6.3.5	Chelatace měďných ( $\text{Cu}^+$ ) iontů v pufru (pH 4.5, 5.5, 6.8, 7.5) .....	45
6.3.6	Statistická analýza.....	47
7.	Výsledky.....	48
7.1	Kalibrační křivka.....	48
7.2	Chelatace měďnatých iontů vybranými benzoovými kyselinami za použití hematoxylinu .....	51
7.3	Chelatace $\text{Cu}^+$ iontů bathokuproinem při poměru benzoových kyselin a měďných iontů při různých hodnotách pH.....	54
7.4	Chelatace $\text{Cu}^{2+}$ iontů bathokuproinem při poměru benzoových kyselin a měďnatých iontů při různých hodnotách pH.....	60
8.	DISKUZE A ZÁVĚR.....	66
9.	POUŽITÉ ZKRATKY.....	69
10.	SEZNAM TABULEK .....	71
11.	SEZNAM OBRÁZKŮ .....	72
12.	POUŽITÁ LITERATURA .....	74

## **Poděkování**

Děkuji paní PharmDr. Janě Karlíčkové, Ph.D. za její ochotu, trpělivost a pomoc při odborném vedení. Chtěla bych také poděkovat Doc. PharmDr. Přemyslovi Mladěnkovi, Ph.D. a Mgr. Václavu Tvrděmu z katedry Farmakologie a toxikologie za pomoc s experimentální částí rigorózní práce. Dále bych také ráda poděkovala Katedře farmaceutické botaniky za poskytnutí laboratoře pro naměření výsledků. Tato rigorózní práce byla podpořena grantem GAUK 170/50/55003 a výzkumným programem PRVOUK P 40.

„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 použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové

Mgr. Eva Gorbunovová

# 1. ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky

**Kandidát:** Mgr. Eva Gorbunovová

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

**Název rigorózní práce:** Porovnání chelatace iontů mědi benzoovými kyselinami

Měď je v lidském těle třetí nejrozšířenější prvek. Je nezbytná pro udržení homeostázy organismu, pro správné fungování enzymů a účastní se různých metabolických drah.

Kyselina benzoová a od ní odvozené kyseliny patří do skupiny fenolových látek, které vznikají při metabolickém zpracování flavonoidů v lidském těle a mohou mít antioxidační, protizánětlivé i protinádorové účinky, kterých by se dalo využít v medicíně.

V této rigorózní práci byla testována měď-chelatační aktivita šesti benzoových kyselin při různých hodnotách pH prostředí pomocí spektrofotometrických metod za použití hematoxylinu a disodné soli bathokuproindisulfonové kyseliny jako indikátorů.

Nejvyšší měď-chelatační aktivitu s měďnatými ionty, za použití hematoxylinu a dále disodné soli bathokuproindisulfonové kyseliny i s měďnými ionty, za použití disodné soli bathokuproindisulfonové kyseliny, vykazovaly dvě kyseliny, a to kyselina 2,4-dihydroxybenzoová a 2-hydroxy-4-methoxybenzoová.

**Klíčová slova:** Fenolové kyseliny, deriváty benzoové kyseliny, měď, chelatace, bathokuproindisulfonová kyselina, hematoxylin

## 2. ABSTRACT

**Charles University**

**Faculty of Pharmacy Hradec Králové**

**Department of Pharmaceutical Botany**

**Candidate:** Mgr. Eva Gorbunovová

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

**Title of Rigorous Thesis:** Comparison of copper ion chelation by benzoic acids

Copper is the third most widespread element in the human body. It is necessary to maintain the homeostasis of the organism, the proper functioning of enzymes, participate in various metabolic pathways.

Benzoic acid and its derived acid belong to a group of phenolic compounds that are formed by the metabolic processing of flavonoids in the human body and can have antioxidant, anti-inflammatory and antitumor effects that could be used in medicine.

In this rigorous thesis, the copper-chelating activity of six benzoic acids was tested at different pH values using spectrophotometric methods using hematoxylin and bathocuproinedisulfonic acid disodium salt as indicators.

The top copper-chelating activity with cupric ions using hematoxylin and the bathocuproinedisulfonic acid disodium salt and copper-chelating activity with cuprous ions using bathocuproinedisulfonic acid disodium salt showed two acids, namely 2,4-dihydroxybenzoic acid and 2-hydroxy-4-methoxybenzoic acid.

**Key words:** Phenolic acids, benzoic acid derivatives, copper, chelating, bathocuproinedisulphonic acid, hematoxylin

### 3. ÚVOD

Měď je jedním z esenciálních stopových prvků, který je zapojen do mnoha fyziologických enzymatických procesů v lidském těle (Říha et al., 2013). Hned po železu a zinku se jedná o třetí nejdůležitější esenciální prvek v lidském organismu (Trojan et al., 2003). Je prokázána souvislost mezi zvýšenou koncentrací mědi v těle a patologickými onemocněními, které jsou touto poruchou podmíněné. Mezi nejznámější z nich patří Wilsonova či Alzheimerova choroba (Mareček et al., 2013; Hane et al., 2016). Měď v těle se nachází ve formě měďnatých iontů. Látky, které by dokázaly tyto měďnaté ionty v těle vychytat a vytvořit s nimi komplexy a snížit tak jejich koncentraci v těle, se jeví jako jedna z možností, jak tato onemocnění léčit.

Pro rostliny jsou životně důležité tzv. primární metabolity, látky, bez kterých by rostliny nepřežily. Jedná se především o sacharidy, z kterých se následně tvoří mastné kyseliny a tuky nebo aminokyseliny, z kterých se tvoří bílkoviny. Tyto primární metabolismy jsou většinou v literatuře znázorňovány pomocí schématických cyklů. Kromě těchto, pro rostlinu životně důležitých drah, probíhají v cytoplazmě i vedlejší tzv. sekundární metabolismy a jejich produkty jsou označovány jako sekundární metabolity. Tyto sekundární metabolity nejsou pro rostlinu životně důležité a mohou se druh od druhu lišit (Jarošová et al., 2010).

Z chemického hlediska, podle struktury, můžeme sekundární metabolity rostlin rozdělit na flavonoidy, fenolové a polyfenolové sloučeniny, terpeny, alkaloidy a sloučeniny síry. Flavonoidy můžeme rozdělit na tři nejdůležitější a nejznámější podskupiny, a to na flavony, flavonoly a flavon-3-oly. Metabolismem flavonoidů v tlustém střevě vznikají fenolové látky. V rigorózní práci se budeme věnovat především benzoovým kyselinám, vznikajícím při metabolismu flavonoidů (Crozier et al., 2016).

## 4. CÍL PRÁCE

Cílem této rigorózní práce bylo stanovit schopnost chelatace iontů mědi v prostředí o různém pH a určit vztah mezi strukturou testovaných látek a jejich chelatační aktivitou. K testování jsme vybrali kyselinu benzoovou, 3-hydroxybenzoovou kyselinu, 4-hydroxybenzoovou kyselinu, 3,4-dihydroxybenzoovou kyselinu, 2,4-dihydroxybenzoovou kyselinu a 2-hydroxy-4-methoxybenzoovou kyselinu.

## 5. TEORETICKÁ ČÁST

### 5.1 Stopové prvky

Stopové prvky lze definovat jako prvky, které jsou přítomny ve většině tkání organismu. Jejich doporučený denní příjem v potravě se pohybuje v mikrogramových až miligramových koncentracích. Stopové prvky můžeme rozdělit do 4 skupin. První esenciální skupina stopových prvků je nezbytná pro správnou funkci organismu a řadíme zde např. selen, zinek, měď. Druhá skupina stopových prvků se pravděpodobně také řadí mezi esenciální prvky důležité pro organismus, např. fluor. Třetí skupinou stopových prvků jsou prvky, u kterých neexistují přesné doklady o jejich působení na živou tkáň a neví se zda jsou považované za esenciální či nikoliv. K této třetí skupině můžeme zařadit např. křemík a titan. Poslední čtvrtá skupina stopových prvků má jednoznačně toxický vliv na lidský organismus a řadíme zde prvky jako jsou olovo, rtuť, kadmium, arzen apod (Batáriová et al., 2007).

#### 5.1.1 Měď

Měď patří mezi ušlechtilé kovy, které se těžily již v dávných dobách. První zmínky o těžbě mědi pocházejí z řeckého Kypru. Proto měď dostala název *cyprium* (kov Kypru). Později se název zkrátil na *cuprum*.

##### 5.1.1.1 Chemické vlastnosti

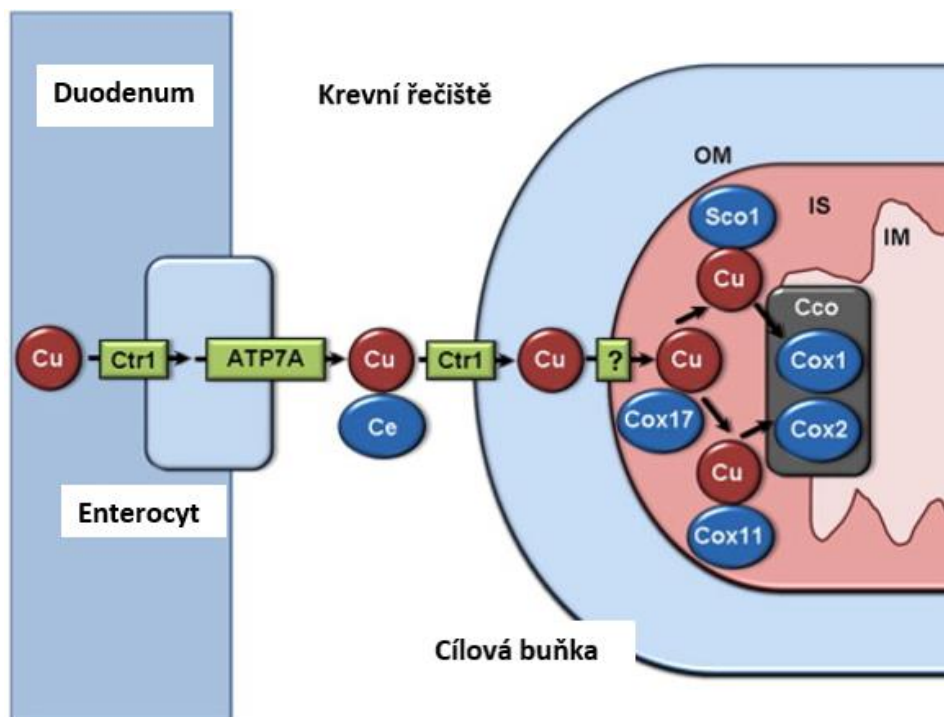
Měď je chemický prvek označovaný zkratkou Cu s protonovým číslem 29. V periodické tabulce prvků se nachází mezi prvky přechodnými. Jedná se o ušlechtilý kov červené barvy. Je to tažný kov, dobrý vodič tepla a elektřiny (Yett et al., 2013).

##### 5.1.1.2 Využití

Měď se v přírodě většinou nachází začleněná do přírodních minerálů. Nejčastější výskyt mědi je ve formě sulfidů, jako například chalkopyrit. Dále se měď může vyskytovat ve formě uhličitánů, jako např. malachit či azurit. Měď

nachází velké uplatnění především v elektrotechnických oborech, kde se používá k výrobě elektrických drátů pro její dobrou vodivost. Dalším odvětvím pro využití mědi je stavebnictví, kde se používá k výrobě okapů a říms. Měď je používána jako součást slitin barevných kovů, jako je např. bronz, mosaz a ty se dále používají pro výrobu zvonků, zvonů, hudebních nástrojů apod (Yett et al., 2013).

### 5.1.1.3 Metabolismus mědi v lidském organismu



Obr.1 **Systémová a mitochondriální doprava mědi** (Rines et al., 2013)

U mužské populace by hodnoty mědi v organismu měly být v rozmezí přibližně od 0,614 do 0,970 mg/l. U žen by tyto hodnoty měly být o 10-20 % vyšší, přibližně tedy od 0,694 až do 1,030 mg/l (Trojan et al., 2003). Měď je absorbována z potravy. K největšímu vstřebávání mědi dochází především v oblasti duodena, první část tenkého střeva. Malá část je také vstřebávána v žaludku a distální neboli konečné části tenkého střeva. Proces vstřebávání mědi do enterocytů je umožněn díky přenašeči CTR1 (transportní protein pro měď 1) v membráně (obr. 1). Díky reduktasám dochází k redukci měďnatých

iontů na měďné, které mohou být přenášeny daným proteinem. Po vstřebání mědi v tenkém střevě dochází k jeho vyloučení do krve pomocí přenašeče ATP7A, kde je ve formě měďnatých iontů vázán na albumin (bílkovina krevní plazmy), transkuprein nebo s nízkou molekulovou hmotností vázán do komplexu měď-histidin. Takto je velká část mědi přenášena do jater, kde je měď skladována ve formě chelátového komplexu, ve formě metalothionu nebo se váže na redukovaný glutathion. Dále může být měď z krve přenášena do mozku, ledvin a srdce. Měď je z lidského organismu vylučována převážně prostřednictvím žluče, přičemž pouze 10-15 % se zpětně reabsorbuje. Malá část mědi je vyloučena také močí, slinami či potem (Hordyjewska et al., 2014; Rines et al., 2013).

#### **5.1.1.4 Biologický význam**

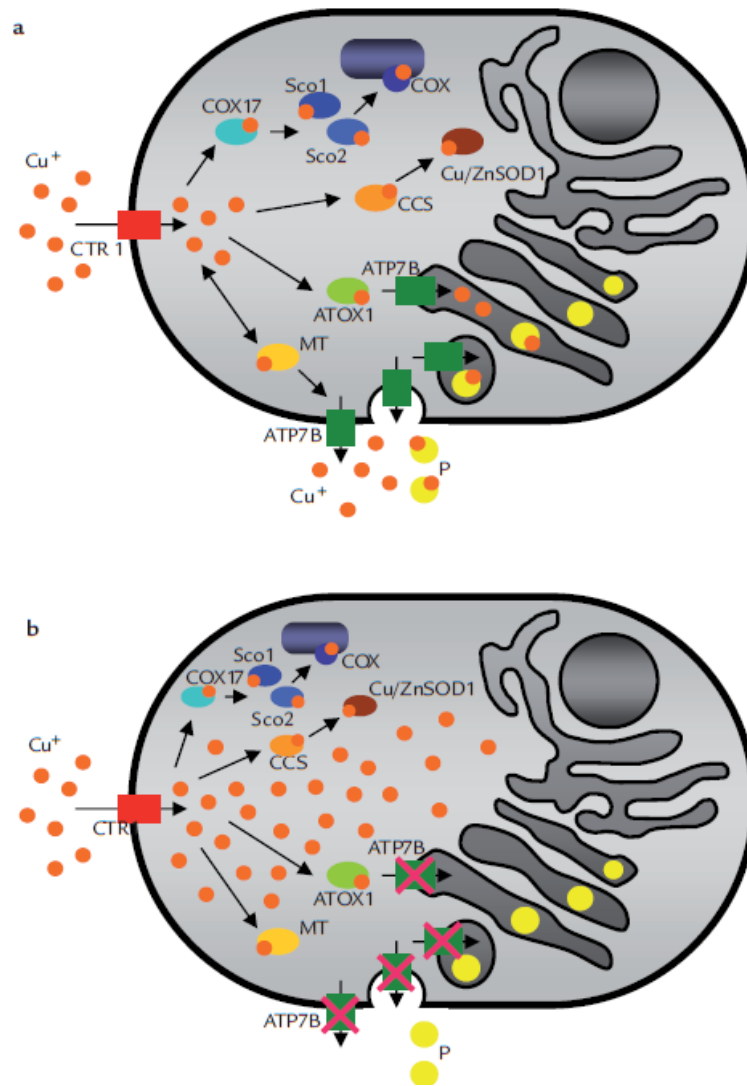
Hned po železu a zinku se jedná o třetí nejdůležitější esenciální prvek v lidském organismu (Trojan et al., 2003). Měď je velmi důležitá pro správné fungování mnoha buněčných procesů například buněčného dýchání, tvorby ATP, oxidace železa a podobně. Hladiny mědi by měly být kontrolovány především z důvodu kumulace mědi, která může vést k oxidačnímu stresu nebo jeho nevhodné vazby na makromolekuly (Rines et al., 2013).

#### **5.1.1.5 Porucha homeostázy mědi a její dopad na lidský organismus**

Porucha homeostázy mědi může mít za následek vážné zdravotní komplikace. Mezi dvě nejnámější onemocnění, které vznikají v důsledku poruchy homeostázy mědi je Wilsonova choroba a Menkesův syndrom (Hordyjewska et al., 2014).

### **Wilsonova choroba**

Wilsonovou chorobou onemocní tři pacienti na 100 000 obyvatel, a tímto se řadí mezi jedno z nejčastějších metabolických onemocnění (Mareček et al., 2013). U Wilsonovy choroby dochází k vrozené poruše metabolismu mědi především v transportéru ATP7B, který je zodpovědný za transport mědi ven z buňky, jehož důsledkem dochází ke kumulaci mědi nejen v buňkách, ale také v orgánech (obr. 2). Nejvíce jsou kumulací zasažena játra a mozek.

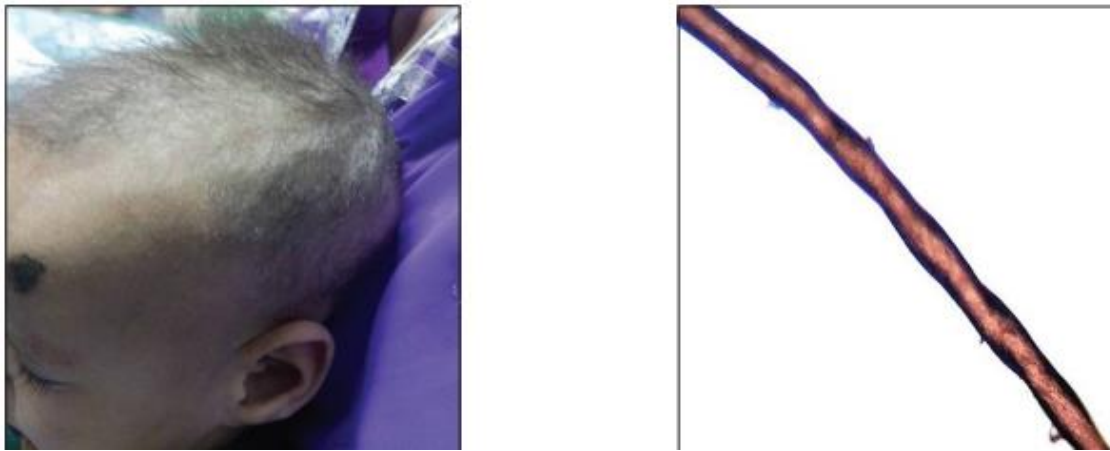


Obr. 2 Znáornění transportu mědi v buňce (a) fyziologický stav; (b) patologický stav způsobený poruchou ATP7B při Wilsonově chorobě (Mareček et al., 2013)

### Menkesův syndrom

Jedná se o chromozomálně podmíněné neurodegenerativní onemocnění, kdy dochází ke změnám v transportéru ATP7A zodpovědného za přenos mědi. Díky této poruše dochází ke snížení koncentrace mědi v organismu. V důsledku deficitu mědi dochází k nedostatečné aktivitě enzymů, které ke své aktivitě měď nezbytně potřebují. Jedná se o velmi vzácné onemocnění s odhadovaným výskytem onemocnění jednoho pacienta ze 100 000 obyvatel. Nejčastějšími důsledky tohoto onemocnění jsou opoždění vývoje, třes, ataxie, svalová

slabost, ale také i změny struktury vlasů, někdy nazývané „*pili Torti*“. Na změnu struktury vlasu se můžeme podívat na obr. 3 (Smpokou et al., 2015).



A

B

Obr. 3 (A) změna struktury vlasů; (B) *pili Torti* (Saha et al., 2015)

### **Ostatní onemocnění způsobené poruchou homeostázy mědi**

Systémové změny, které jsou způsobené poruchou homeostázy mědi, jsou spojené i s dalšími chronickými onemocněními, jako je například diabetes mellitus. U těchto pacientů, ve srovnání se zdravou populací, nacházíme vyšší koncentrace mědi.

Dále zvýšené koncentrace mědi jsou zaznamenávány také u pacientů se specifickými typy rakoviny, jako je rakovina prsu, děložního čípku, vaječníků, plic, prostaty, žaludku či leukémie. Tato onemocnění se dávají do spojitosti s poruchou homeostázy mědi, především s její zvýšenou koncentrací, kdy v jejím důsledku dochází ke zvýšenému oxidačnímu stresu a následně ke zvýšení bazálního metabolismu či zvýšené pravděpodobnosti mitochondriální mutace. Poslední studie ukazují, že zvýšené koncentrace mědi mohou mít vliv na genovou expresi. Změny vyvolané v důsledku poruchy homeostázy mědi mohou vést až k rozvoji karcinogeneze.

Naopak při nedostatku mědi může docházet u pacientů k rozvoji anémie či neutropenie (Squitti et al., 2014).

## 5.2 Sekundární metabolismus rostlin

Rostliny jsou schopné syntetizovat velké množství organických sloučenin. Obecně je můžeme rozdělit na primární a sekundární metabolity. Jak jsme se již zmiňovali v úvodu práce, primární metabolity jsou pro rostlinu životně důležité, bez nich by existence dané rostliny nebyla možná. Hrají velmi důležitou roli v procesech jako je fotosyntéza, dýchání rostlin, správný růst a vývoj rostliny. Sekundární metabolity nejsou pro rostliny životně důležité, přesto hrají důležitou roli například při ochraně rostliny před predátory, chrání rostlinu před UV zářením, pomáhají přilákat opylovače a podobně. Obecně můžeme říci, že sekundární metabolity jsou specifické pro daný druh a mohou se druh od druhu lišit (Crozier et al., 2016; Jarošová et al., 2010).

Z chemického hlediska podle struktury můžeme sekundární metabolity rostlin rozdělit na flavonoidy, fenolové a polyfenolové sloučeniny, terpeny, alkaloidy a sloučeniny síry. V rigorózní práci se budeme věnovat především benzoovým kyselinám, vznikajícím při metabolismu flavonoidů.

Flavonoidy se hojně vyskytují v běžné potravě. V ovoci je najdeme především v červeném víně, jablčích, modrých švestkách, meruňkách, citróněch, limetkách, grepfruitech či pomerančích. V zelenině se hojně vyskytují v rajčatech, cibuli, šalotce, brokolici, kapustě, zelí, celeru či paprice (Andersen et al., 2006). Stále více se dozvídáme o jejich blahodárných účincích na lidský organismus především v oblasti metabolismu a srdeční činnosti. Byly prováděny i studie, které ukazují jejich pozitivní vliv u Parkinsonovy choroby či v terapii nádorových onemocnění (Cassidy et al., 2017).

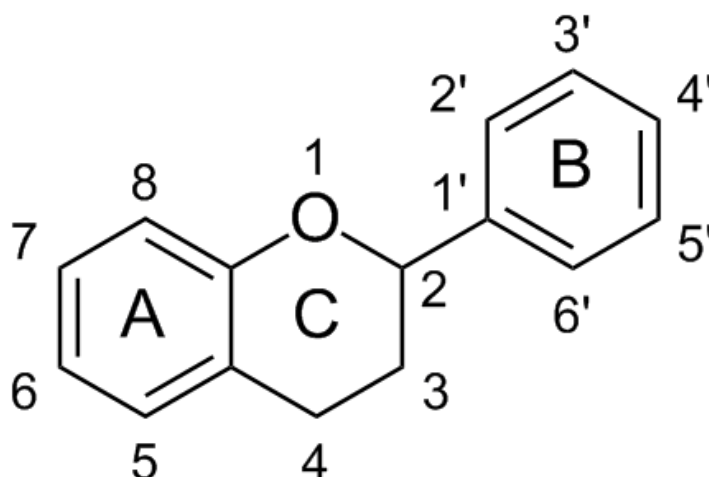
Při jejich zkoumání bylo zjištěno, že chemická struktura různých typů flavonoidů je zodpovědná za jejich účinnost na organismus. Struktura je tedy důležitá pro biologickou dostupnost a jejich následnou aktivitu. Absorpce je závislá na fyzikálně-chemických vlastnostech, molekulové hmotnosti, jejich rozpustnosti ve vodě, v tucích. V neposlední řadě také na pKa jednotlivých zástupců (Hollman 2004). Biologická dostupnost je velmi proměnlivá u jednotlivých flavonoidů podle jejich chemické struktury. Po požití flavonoidů dochází k jejich rozsáhlé metabolizaci a absorpci v tenkém střevě. Tato absorpce se může pohybovat mezi 0-60 % (Cassidy et al., 2017).

### 5.2.1 Flavonoidy

Flavonoidy patří mezi polyfenolové sloučeniny, které se přirozeně vyskytují v rostlinách. Ve velké míře jsou zastoupeny v ovoci, zelenině, obilí, bylinách. Zatím bylo objeveno kolem 5 000 různých flavonoidů a s jistotou můžeme říci, že několik set je obsaženo v běžně konzumované potravě. Flavonoidy můžeme dále členit podle jejich struktury, především stupněm hydroxylace, substituce a konjugace na základní strukturu, která je pro všechny stejná (Clark et al., 2015). Některé flavonoidy jsou vyhledávány pro své antioxidační a protizánětlivé vlastnosti, přispívající k celkové detoxikaci organismu (Yadav et al., 2015).

#### 5.2.1.1 Struktura a rozdělení flavonoidů

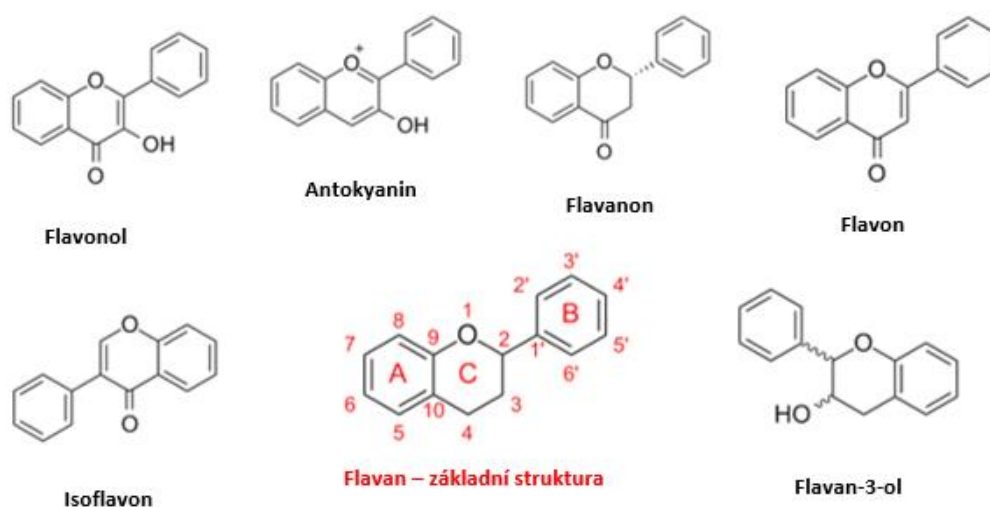
Flavonoidy jsou polyfenolové sekundární metabolity rostlin, které se mohou vyskytovat ve formě aglykonu (tzn. neobsahují žádnou cukernou složku) nebo naopak ve své struktuře cukernou složku obsahují a tyto se nazývají glykosidy (Gherida, 2005). Základní struktura flavonoidů se nazývá flavan (obr. 4) a je složena ze dvou benzenových jader (kruhů A + B). Tyto dva kruhy jsou spolu propojeny přes tři uhlíkaté řetězce obsahující kyslík a spolu dohromady tvoří 2H-pyran (kruh C) (Říhová, Kvasničková 2008).



Obr. 4 Flavan – základní struktura flavonoidů (Říhová et al., 2008)

Flavonoidy můžeme dále členit podle jejich struktury, především stupně hydroxylace, substituce a konjugace na základní strukturu (Clark et al., 2015).

Dále můžeme flavonoidy dělit podle van Acnera na flavonoly, flavony, flavanony, katechiny (nebo flavanoly), anthokyanidiny, dihydroflavonoly, chalkony a isoflavonoidy. Nejdůležitější podskupiny a flavonoidů jsou zobrazeny na obr. 5 (Říhová et al., 2008).



Obr. 5 Nejdůležitější podskupiny flavonoidů (Crozier et al., 2006)

### 5.2.1.2 Biosyntéza flavonoidů

Flavonoidy jsou syntetizovány pomocí tzv. fenylypropanoidní nebo polyketidové dráhy. Prekurzory pro syntézu jsou většinou malonyl-CoA, který se účastní fenylypropanoidní dráhy a p-kumaroyl-CoA, který naopak polyketidové dráhy.

Základní látky, které vstupují do fenylypropanoidní dráhy, jsou aromatické aminokyseliny, především fenylalanin a tyrosin. Enzymy, které jsou nezbytné pro správný průběh syntézy flavonoidy, jsou fenylalanin amoniak lyasa cinnamát-4-hydroxylasa a 4-kumarát-CoA ligasa. Meziprodukt, který vzniká při složité biosyntéze flavonoidů je tzv. chalkon, který je katalyzován enzymem

chalkon syntasou a dává celému meziprojektu žluté zbarvení. Chalkony ovšem nejsou konečným produktem dané reakční dráhy a pomocí dalších enzymatických kroků dochází k syntéze flavonoidů, dihydroflavonoidů přes katechiny až k anthokyanům (Singh et al.,2017).

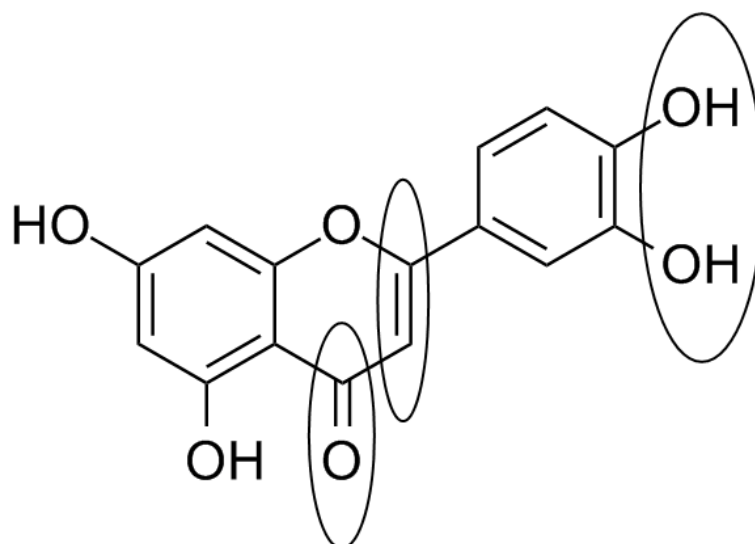
### **5.2.1.3 Biologická aktivita**

Flavonoidy představují širokou skupinu sekundárních metabolitů rostlin. Jsou pro dané rostliny nepostradatelné, plní celou řadu důležitých fyziologických funkcí, jako je například ochrana rostlin před oxidačním stresem, chrání rostliny před mikroorganismy. Dále působí jako molekulové receptory, dokonce chrání rostliny před UV zářením. V neposlední řadě hrají významnou roli ve fixaci dusíku, který je nepostradatelný pro další správný růst a vývoj rostliny (Karabin et al., 2014).

Flavonoidy byly také popsány jako agens, které podporují zdraví s prokázanou biologickou účinností, jak *in vivo* tak *in vitro*. Jejich nejdůležitější aktivita pro lidský organismus je antioxidační účinek, ochrana organismu před volnými radikály, jejich enzymatický modulační účinek či jejich prokázaná inhibice buněčné proliferace. V neposlední řadě se dají využít jejich antibiotické, antikarcinogenní, protizánětlivé či estrogenní působení na lidský organismus (Karabin et al., 2014).

## Antioxidační aktivita

Skoro téměř každý zástupce flavonoidů má antioxidační aktivitu. Tato aktivita závisí na jejich chemické struktuře (obr. 6) především navázaných hydroxylových skupinách na základním skeletu. Počet hydroxylových skupin ovlivňuje schopnost flavonoidů působit antioxidačně (Kumar et al.,2013).



Obr. 6 **Chemická struktura ovlivňující antioxidační účinek flavonoidů**  
(Lago et al., 2014)

Antioxidační aktivita flavonoidů je závislá především na:

- fenolové skupině v kruhu B
- hydroxylové skupině v poloze C'3 a C'4
- hydroxylové skupině v poloze C3 a C5 spolu s karboxylovou skupinou v poloze C4, které mají za následek vyšší antioxidační účinek

V organismu se mohou vyskytovat reaktivní formy kyslíku, například hydroxid, superoxid, hydroxyperoxid apod., které vznikají při normálním aerobním metabolismu *in vivo* a ty následně způsobují oxidační stres a následné oxidační poškození DNA, proteinů a lipidů.

Tyto reaktivní formy vznikají za působení enzymů především NADPH oxidasy, lipooxygenasy, xantinoxidasy. Bylo prokázáno, že katechiny a kvercetin inhibuje xantinoxidasu a tím se snižuje tvorba peroxidových a kyslíkových radikálů.

Flavonoidy inhibují NADPH oxidasu. V závislosti na struktuře, bylo zjištěno, že pokud jsou flavonoidy nasycené, to znamená bez dvojné vazby mezi C2 a C3, jsou účinnější než flavonoidy nenasycené. Pokud flavonoidům chybí substituovaný kruh B, nemají účinnost na NADPH oxidasu vůbec.

Pokud mají flavonoidy schopnost tvořit cheláty s bivalentními kovy, jsou schopny inhibovat enzym lipooxygenasu zodpovědnou za oxidaci proteinů o nízké hustotě LDL, což je jedna z hlavních příčin aterosklerózy (Karabin, et al., 2014).

### **Antikarcinogenní účinky**

Flavonoidy jsou schopny inhibovat proliferaci nádorových buněk, což vede k zastavení růstu nádoru. Aktivně se podílejí na inhibici karcinogeneze v počátečních, propagační a pozdní fázi buněčné proliferace. Antikarcinogenní účinnost flavonoidů je připisována především jejich schopnosti inhibice metabolické aktivace prokarcinogenních agens a indukci karcinogenních detoxikačních enzymů. V pokročilých stádiích nádorů jsou schopny flavonoidy potlačit proces tím, že inhibují syntézu DNA, inhibují angiogenezi a indukují apoptózu nádorových buněk (Karabin et al., 2014). Mezi nadějnou rostlinu a její sloučeniny patří *Cassia angustifolia* (*Senna alexandrina*, Fabaceae). Je to rychle rostoucí keř původem ze Saudské Arábie, Egypta a Jemenu (Ahmed et al., 2016).

### **Protizánětlivé účinky**

Odhaduje se, že přibližně 18 % všech typů rakoviny jsou spojeny s chronickými záněty. Při zánětlivých procesech dochází k produkci tkáňových aktivátorů, zánětlivých působků, zejména prostaglandinů a oxidu dusnatého, které v počátečních fázích iniciují obecné zánětlivé procesy. Bylo prokázáno, že

flavonoidy inhibují klíčový enzym, který je zodpovědný za tvorbu oxidu dusnatého a prostaglandinů.

Flavonoidy inhibují kyselinu arachidonovou, prostřednictvím inhibice genové exprese COX-1 (*cyklooxygenasa-1*) a COX-2 (*cyklooxygenasa-2*), která je následně zodpovědná za tvorbu prostaglandinů z kyseliny arachidonové (Karabin et al., 2014).

*Smilax china*, Smilacaceae, je rostlina, která je velmi hojně rozšířena v Jižní Číně a jihovýchodní Asii. Listy z této rostliny se tradičně používají jako antioxidant, zatímco oddenky nazývané „Jin Gang Teng“ se sbírají a následně se využívají v tradiční čínské medicíně především pro jejich imunosupresivní, antioxidační a protizánětlivé účinky. Nejvíce se využívá při léčení zánětlivých onemocnění v oblasti pánve a chronických onemocnění ženských pohlavních orgánů (Zhong et al., 2017).

### **Estrogenní aktivita**

Další důležitá aktivita některých flavonoidů je jejich schopnost estrogenní aktivity, napodobující lidské steroly především 17- $\beta$ -estradiol, čímž jsou schopné snížit riziko hormonálně vyvolané rakoviny.

Mezi rostliny, které mají tuto estrogenní aktivitu můžeme zařadit *Humulus lupulus* (Cannabaceae), *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) či *Trifolium pratense* (Fabaceae) hojně se vyskytující i u nás (Chadwick et al., 2006).

Strukturálně podobné flavonoidy s estrogeny umožňují jejich použití v lidském organismu. Estrogenních vlastností flavonoidů můžeme využít dvěma způsoby.

První způsob je při použití flavonoidů jako agonistů estrogenových receptorů, kdy mechanismus účinku spočívá v aktivaci receptorů pro estrogen. V konečném důsledku to pro organismus znamená, že se flavonoidy v lidském organismu chovají podobně jako estrogeny.

Druhý způsob využití flavonoidů je na základě jejich schopností působit jako enzymové efektory. Flavonoidy mohou inhibovat enzym aromatasu, který je

zodpovědný za regulaci hladiny krevního estradiolu přeměnou androgenů, především androstendiolu a testosteronu na estrogeny v prsu. Byly prováděny studie, které ukazují abnormálně zvýšenou hladinu aromatasy při exprimující rakovině prsu typu *SK-BR-3* a zde se flavonoidy ukazují jako potencionální možnost řešení daného problému (Karabin et al., 2014).

Další nezanedbatelnou výhodou flavonoidů s estrogenními účinky je jejich předpokládaná schopnost pozitivně ovlivnit prevenci osteoporózy u postmenopauzálních žen, kdy v důsledku fyziologického úbytku hladiny estrogenů v krvi postmenopauzálních žen dochází ke snížení celistvosti kostní tkáně, která je zapříčiněna zvýšeným uvolňováním vápníku do krve a k řidnutí kostí (Karabin et al., 2014).

### **Antimikrobiální aktivita**

Flavonoidy mají velmi široké antimikrobiální působení proti různým mikroorganismům, včetně bakterií, virů, hub a prvoků.

Byly prováděny studie, které ukazují, že prenylovaný flavonoid xanthohumol, vyskytující se výhradně v chmelu, je schopný inhibovat růst gram pozitivních bakterií *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus mutans*. Další látka ze skupiny flavonoidů myricetin, je schopná inhibovat růst multirezistentní bakterie *Burkholderia capacia*, což jsou vankomycin-rezistentní enterokoky a dalších lékařsky významných bakterií jako jsou *Klebsiella pneumoniae* a *Staphylococcus epidermidis*.

Další studie s xanthohumolem ukazují jeho schopnost antivirového působení spolu v kombinaci s interferonem  $\alpha$ -2b proti viru způsobujícího bovinní průjem, který se vyznačuje jistou podobností s virem lidské hepatitidy typu C, *Herpes simplex* virem *HVS-1* a *HVS-2*, cytomegalovirem *CMV* a rhinovirem. Koncentrace potřebné k antivirovému působení u xanthohumolu byly v rozmezích mezi 4,2-7,6 mikromolů.

Aktivita flavonoidů byla zkoumána i v souvislosti s HIV-virem, kde byla zjištěna jejich schopnost inhibice reverzní transkriptasy nebo RNA polymerasy (Karabin et al., 2014).

## **Antidiabetická aktivita**

Flavonoidy jsou schopné anti-diabetické aktivity díky inhibici  $\alpha$ -glukosidasy. Je to enzym řídící postprandiální hladiny glukózy v krvi. Díky působení tohoto enzymu dochází k zabránění přebytku absorpce glukózy v tenkém střevě a dochází k snížení hyperglykémie. Tohoto jevu by se dalo velmi dobře využít v řešení diabetes mellitus II. typu.

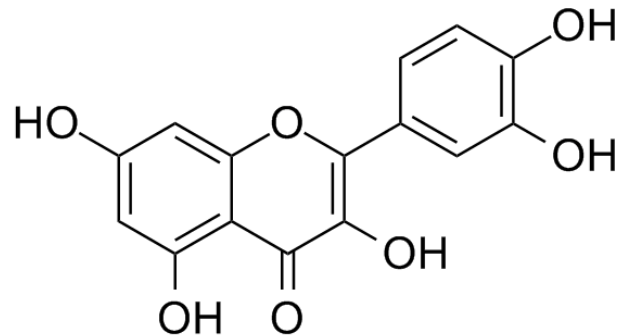
Další možností pro využití flavonoidů, především kvercetin, je jeho schopnost inhibovat glykogen fosforylasu, klíčového enzymu v regulaci metabolismu glykogenu. Inhibice tohoto enzymu se považuje za velmi prospěšnou při léčení diabetes mellitus II. typu (Karabin et al., 2014).

## **Další využití flavonoidů**

Kromě výše popsaných aktivit flavonoidů na lidský organismus, můžeme dále využít jejich účinnosti v oblasti antialergické, antikoagulační, antiagregační anebo také je použít při léčebné strategii při Alzheimerově chorobě. Navíc se flavonoidy zapojují do modulace jaterní exprese, dále se podílejí na distribuci a metabolismu hormonů štítné žlázy. Kromě toho některé flavonoidy, např. *kempferol*, *kvercetin*, *xanthohumol*, *isoxanthohumol* a další, mají potenciál pro použití v léčebné kosmetice tzv. dermokosmetice, především v řešení kožních problémů jako je atopický ekzém, kontaktní dermatitida nebo pigmentové poruchy (Karabin et al., 2014).

#### 5.2.1.4 Příklad zástupců flavonoidů v běžné stravě

### Kvercetin



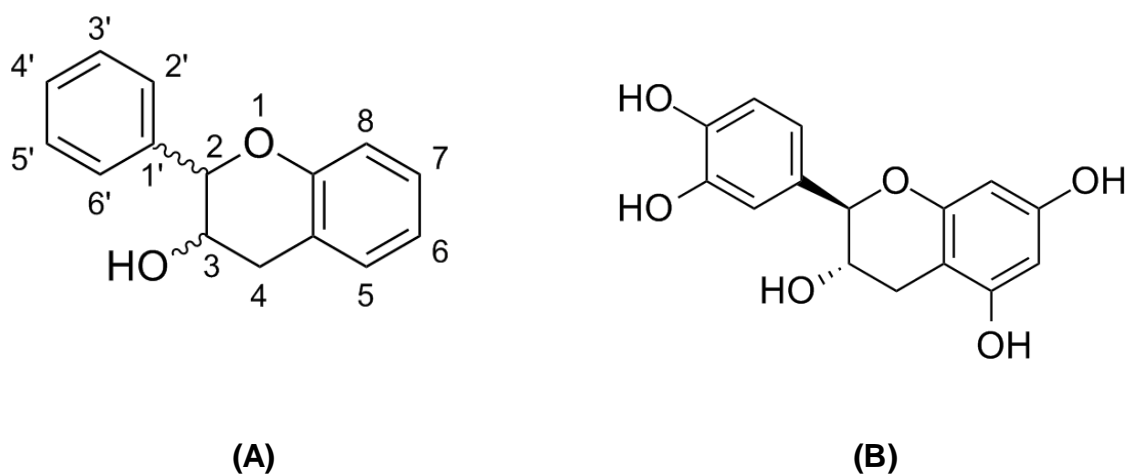
Obr. 7 Chemická struktura kvercetinu (Vidak et al., 2015)

Kvercetin (obr. 7) a jeho deriváty jsou látky hojně se vyskytující v běžné stravě a potravinových doplňcích, kde je přítomen většinou v glykosidové formě. Běžně se kvercetin vyskytuje v ovoci a zelenině jako jsou například jablka, citróny, salát, červené hrozny, zelí, rajčata, cibule, hrušky, švestky, třešně. Největší obsah kvercetinu mají kapary, bezinky a listy libečku. Můžeme ho také najít v černém a zeleném čaji, v červeném víně, kakau a olivovém oleji.

K dosažení koncentrací potřebných pro pozitivní účinky kvercetinu na lidský organismus, jeho konzumace pouze ve stravě bohaté na kvercetin nestačí. Kvercetin se špatně vstřebává ve střevech.

Kvercetin má velmi vysoký antioxidační účinek, podle studií dokonce šestkrát vyšší než kyselina askorbová. Další výsledky ukazují jeho protektivní vliv na srdce a plíce, kde pomáhá snižovat riziko vzniku karcinomu plic a astmatu. Studie prováděné na buňkách ukázaly jeho antifibrotické, antibakteriální, antikoagulační, antiaterogenní, antihypertenzní a antiproliferační účinky (Vidak et al., 2015).

## Katechiny



Obr. 8 (A) obecná struktura flavan-3-ol; (B) (+) - katechin (2R, 3S) častější ze dvou enantiomerů (Vidak et al., 2015)

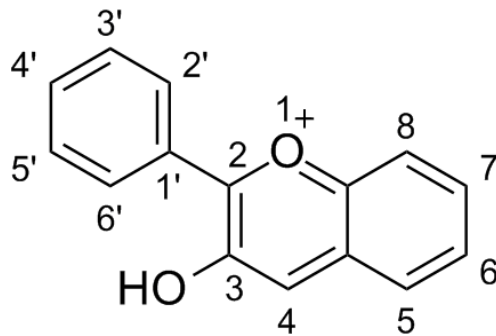
Katechiny strukturálně vychází z flavon-3-olu (obr. 8 A). Katechinové deriváty (obr. 8 B) běžně se vyskytující v potravě jsou epikatechiny a epigallokatechiny a jejich deriváty. Tyto deriváty se nejčastěji vyskytují v potravinách ve formě glykosidů.

Nejvyšší obsah katechinů nacházíme v kakau a z něj vyráběné čokoládě. Dalšími potravinami bohatými na katechiny jsou černý a zelený čaj, také červené víno, fazole, jablka, jahody, třešně a podobně.

Katechiny, především epikatechin a epigallokatechin, jsou velmi silné antioxidanty. Problém je nízká biologická dostupnost po podání. Doplnky stravy obsahující nemetabolizované izolované katechiny, které po podání dosahují místně dostatečně vysokých koncentrací v zažívacím traktu, kde působí protektivně na celý zažívací trakt, chrání jeho buňky před oxidačním stresem a tím ho chrání i před maligními změnami. Pravidelným používáním katechinu se snižuje riziko rozvoje karcinomu trávicího traktu. Byly provedeny studie na zvířecích modelech, které ukazují, že při pravidelném podávání dostatečně vysokých koncentrací katechinů dochází k inhibici karcinomu jater, prsu a prostaty. Katechiny jsou schopny i pozitivně modulovat imunitní odpověď,

potlačovat hyperlipidemii, zabraňují rozvinutí hepatotoxicity a nefropatie a celkově přispívají k protekci celého kardiovaskulárního systému (Vidak et al., 2015).

## Proanthokyanidiny



Obr. 9 **Obecná struktura proanthokyanidinů** (Vidak et al., 2015)

Molekuly flavan-3-olu jsou schopné mezi sebou tvořit etherové vazby, což vede k tvorbě polymerů a oligomerů, souhrnně označovaných jako proanthokyanidiny (obr. 9). Počet monomerních jednotek představuje stupeň polymerace. Oligomery jsou charakterizovány stupněm polymerace nižším nebo rovným 10, zatím co polymery mají stupeň polymerace vyšší než 10.

Příklady, běžně se vyskytujících proanthokyanidinů v potravě, jsou jablka, hrozny, švestky, hrušky, černý rybíz, mandle, pistácie a podobně. Potraviny obsahující převážně oligomery jsou například banány, třešně, mango, avokádo, kiwi, arašídny a pivo. Je zajímavé, že výtažky z kůry borovice obsahují 65 % až 75 % proanthokyanidinů a tento výtažek je komerčně dostupný. Dalším doplňkem stravy bohatým na proanthokyanidiny je výtažek ze semen hroznů.

Proanthokyanidiny mají sníženou biologickou dostupnost, která je zapříčiněná sníženým metabolismem polymerních a oligomerních jednotek žaludečními kyselinami a enzymy. Přesto existují některé proanthokyanidiny,

kteře jsou schopné štěpit naše střevní bakterie tlustého střeua. Produkty střeálních bakterií jsou většinou fenolové kyseliny. Jako příklad můžeme uvést fenylactovou, fenylpropionovou, fenylvalerovou a benzoovou kyselinu, které jsou absorbovány snadněji než nemetabolizované proanthokyanidiny.

Proanthokyanidiny mají vysoké antioxidační působení, kterým jsou schopny protektivně chránit myokard, především neutralizací volných radikálů. Jsou schopny inhibovat apoptické procesy v kardiomyocytech. Studie, které byly prováděny s proanthokyanidy naznačují i jejich gastroprotektivní a antiulcerogenní účinek.

Příkladem protektivního účinku proanthokyanidinů na lidský organismus může být brusinkový džus, kdy proanthokyanidiny obsažené v jeho šťávě zabraňují adhezi patogenních bakterií na buněčný epitel močových cest. Dalším příkladem mohou být proanthokyanidiny obsažené ve skořici, které zlepšují metabolismus lipidů a glukosy (Vidak et al., 2015).

## Fenolové látky

Fenolové látky jsou obsaženy přímo v rostlinách (viz str. 27-33), ale také vznikají metabolismem flavonoidů v tlustém střevě (viz str. 33-35).

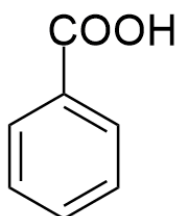
### 5.2.2 Benzoová kyselina

Kyselina benzoová je nejjednodušší aromatická jednosytná karboxylová kyselina (obr. 10). Od ní je odvozená celá skupina polyfenolových kyselin. Původně se získávala převážně v Asii z pryskyřice stromů patřících do rodu *Styrax*. Tato pryskyřice voní jako vanilka. Díky této vůni se uplatňuje především v parfumerii a při výrobě kadidel, ale také ve farmacii a tradiční čínské medicíně. V českém lékopise se tato pryskyřice nazývá pryskyřice benzoé a existují její dva druhy, sumaterská a siamská. Benzoová sumaterská pryskyřice se získává ze *Styrax benzoin* (Styracaceae). Benzoová siamská pryskyřice se získává ze *Styrax tonkinensis* (Styracaceae). Následně je z nich připravována *Benzois sumatrani tinctura* a *Benzois tonkinensis tinctura*. Dnes se kyselina benzoová většinou připravuje synteticky. Nejčastější průmyslová příprava této kyseliny je dekarboxylací anhydridu kyseliny ftalové v přítomnosti katalyzátoru, v tomto případě oxidu zinačnatého, a následnou reakcí chlóru s toulenem za

vzniku trichloroutoulenu, který následně podléhá hydrolyze a vzniká kyselina benzoová (Lewis, 2001; Crampton, 2014; Du et al., 2016; Český lékopis, 2009).

Kyselinu benzoovou najdeme i v rostlině *Taxus baccata* (Taxaceae). Vědci se začali zabývat touto čeledí v souvislosti s účinnou látkou paklitaxel, která je registrovaná pod protinádorovým léčivem Taxol (Parmar et al., 1999).

Tuto kyselinu také najdeme v *Prunus persica* (Rosaceae) neboli broskvoň obecná. V roce 2017 poprvé identifikovali 49 látek z extraktu z broskvových kořenů za pomoci ethanolu. Kyselina benzoová byla v zastoupení 8,65% (Wei et al., 2017).



Obr. 10 **Kyselina benzoová**

### 5.2.3 3-hydroxybenzoová kyselina

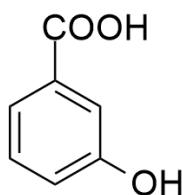
Když byla před více než 185 léty objevena kyselina salicylová (2-hydroxybenzoová kyselina) v rostlině *Salix* (Salicaceae), začalo se uvažovat o možnostech její obměny a následných účincích na lidský organismus. Při bližším zkoumání byla objevena 3-hydroxybenzoová kyselina (obr. 11). Zjistilo se, že je antagonistou HCA receptorů (hydroxykarboxylových receptorů). Jedná se o typ G-proteinů, které jsou z velké části umístěny na adipocytech. Jejich aktivací dochází k inhibici lipolýzy. Tohoto účinky by se v budoucnu dalo využít v řešení některých metabolických onemocněních.

Byly prováděny testy na laboratorních zvířatech. Zvřatům se podávala kyselina 3-hydroxybenzoová v denní dávce nižší než 30 mg/kg. Při opakované expozici touto kyselinou, docházelo ke snížení fyziologických stresových

odpovědí organismu na každodenní zacházení a testování (Khan et al., 2016; Juurling et al., 2014).

Tuto 3-hydroxybenzoovou kyselinu obsahuje dřevina *Taxus baccata* (Taxaceae). Různé druhy tisů se vyskytují v Evropě, Severní Americe, Číně, Japonsku i Indii (Parmar et al., 1999).

Najdeme ji například i v rostlině *Hedychium spicatum* (Zingiberaceae). Jedná se o vytrvalou bylinu, která roste v nadmořské výšce od 1200-2800 metrů nad mořem. Roste od Himalájí přes Kašmír, Nepál, Severní Thajsko až po Čínu. Její usušené oddenky se sbírají a využívají pro jejich protizánětlivé, analgetické, antibakteriální, antiastmatické a jiné léčebné vlastnosti. Tradičně jsou oddenky konzumovány místními obyvateli, kteří je vaří a jedí se solí. Plody z této byliny se také vaří a jí v pikantních pokrmech (Sandeep et al., 2017).

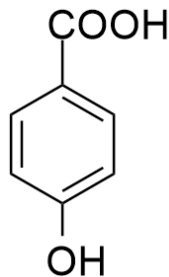


Obr. 11 **Kyselina 3-hydroxybenzoová**

#### 5.2.4 4-hydroxybenzoová kyselina

Tato kyselina, označovaná jako kyselina *p*-hydroxybenzoová (obr. 12), se vyskytuje v rostlině nazývané drmek obecný (*Vitex agnus-castus*, Verbenaceae) neboli mnišský pepř, dále v palmě akai (*Euterpe oleracea*, Arecaceae), především v oleji, který se získává z jejich plodů nebo je obsažena i v mykorrhizních kořenech smrku ztepilého (*Picea abies*, Pinaceae). Estery, které vznikají esterifikací z kyseliny *p*-hydroxybenzoové, jsou souhrnně označovány jako parabeny a mají široké využití především jako konzervanty. Kyselina 4-hydroxybenzoová je antioxidant. Při zkouškách *in vitro*, *in vivo* byla objevena její estrogení aktivita.

Při testování na zvířatech byla objevena i protizánětlivá aktivita. Výhodou je, že spolu s kyselinou 3-hydroxybenzoovou neinhibují syntézu prostaglandinu (Navrátilová, 2015; Khan et al., 2016, Wikipedia, 2017, [online]).



Obr. 12 Kyselina 4-hydroxybenzoová

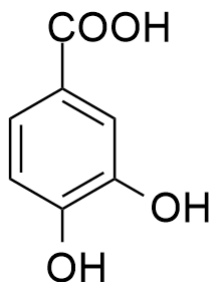
### 5.2.5 3,4-dihydroxybenzoová kyselina

Tuto kyselinu můžeme najít i pod názvem kyselina protokatechová (obr. 13) a je široce rozšířena v běžně konzumovaných potravinách. Můžeme ji najít například v pohance, borůvkách, v jablcích, avokádu, olivovém oleji, pивě, jahodách, malinách, hruškách, cibuli a v dalších. Bylo prokázáno, že vyšší koncentrace kyseliny protokatechové mají protizánětlivé vlastnosti, zatímco v nižších koncentracích se ukazuje jako antioxidant (Ajiboye et al., 2017).

Tuto kyselinu lze izolovat z rostliny *Clerodendrum volubile* (Lamiaceae). Poprvé tuto kyselinu izolovali při testech prováděných ve spojitosti s diabetes mellitus II. typu. Testy byly prováděny na laboratorních potkanech. Při použití oleje získávaného z této rostliny, obsahující kyselinu protokatechovou, dochází při akutní fázi tohoto onemocnění ke snížení hladiny glukózy, k zvýšení funkce  $\beta$ -buněk pankreatu a z odebrané krve výsledky vykazují zvýšení hladiny sérového inzulínu (Erukainure et al., 2017).

3,4-dihydroxybenzoovou kyselinu najdeme i v rostlině *Salvia miltiorrhiza* (Lamiaceae), označovanou jako Dan-shen, kterou používají v tradiční Asijské medicíně především k léčení kardiovaskulárních onemocnění (Hung et al., 2009).

Při bližším zkoumání *Labisia pumila* (Myrsinaceae), léčivé rostliny používané především v Malajsii, byla izolována i 3,4-dihydroxybenzoová kyselina. Místní ji používají především při komplikacích při a po porodu, ale také u menstruačních bolestí (Al-Mekhlafi et al., 2012).



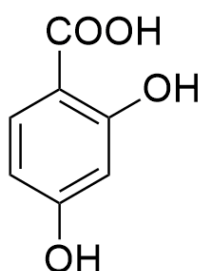
Obr. 13 **Kyselina 3,4-dihydroxybenzoová**

### 5.2.6 2,4-dihydroxybenzoová kyselina

Jedná se o jeden z degradačních metabolitů anthokyaninů obsažených ve višni obecné (*Prunus cerasus*, Rosaceae). Anthokyaniny mají výborné protizánětlivé účinky a antioxidační vlastnosti. Byly prováděny studie, které zkoumaly účinnost kyanidinu (hlavní anthokyanin obsažen ve višni obecné), především v možnosti prevence zánětu a rakoviny tlustého střeva. Tento anthokyanin je v těle rozkládán na kyselinu protokatechovou, 2,4-dihydroxybenzoovou (obr. 14) a 2,4,6-trihydroxybenzoovou (Seeram et al., 2001).

Tato 2,4-dihydroxybenzoová kyselina je obsažena v rostlině *Hypericum perforatum* (Hypericaceae). Jedná se o farmaceuticky významnou rostlinu především díky jejímu uplatnění při mírných až středně těžkých formách deprese (Cirak et al., 2016).

Při bližším zkoumání *Kalopanax septemlobus* (Araliaceae) na HPLC byly izolovány 4 sloučeniny, jedna z nich byla kyselina 2,4-dihydroxybenzoová. Tato rostlina se zkoumá především pro její protinádorovou aktivitu (Bai et al., 2011).



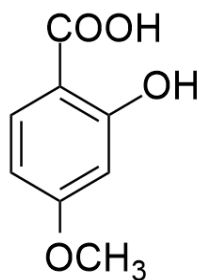
Obr. 14 Kyselina 2,4-dihydroxybenzoová

### 5.2.7 2-hydroxy-4-methoxybenzoová kyselina

Kyselina 2-hydroxy-4-methoxybenzoová (obr. 15) je produktem parní destilace z rostliny zvané *Hemidesmus indicus* (Aslepiadaceae), kterou můžeme najít i pod označením indická sarsaparilla. Obsahuje vysoké množství taninů a beta-sitosterolů. Existuje i druh *Hemidesmus pubescens* (Aslepiadaceae), která má vyšší obsah fenolů a volných aminokyselin. Jedná se o běžně se vyskytující byliny rozšířené v celé Indii. Při studiích *in vivo* i *in vitro* se velmi osvědčila *Hemidesmus indicus* především díky svým protizánětlivým, analgetickým, antipyretickým, antioxidačním, hepatoprotektivním, kardioprotektivním, renoprotektivním či imunomodulačním vlastnostem. Hojně se využívá v tradiční indické medicíně. Z byliny se využívá především její kořen (Sircar et al., 2007; Das et al., 2013).

Tuto 2-hydroxy-4-methoxybenzoovou kyselinu najdeme i v *Calophyllum polyanthum* (Calophyllaceae), některé obsahové látky především kаланolid A, B a inofyllum B, P vykazují významnou anti-HIV aktivitu (Ma et al., 2004).

Další rostlinou, která obsahuje kyselinu 2-hydroxy-4-methoxybenzoovou je *Platycodon grandiflorum* (Campanulaceae). V Evropě je tato rostlina brána spíše jako okrasná, ale v Číně, Japonsku a Koreji ji využívají pro její léčebné vlastnosti. Používá se pro její ekpektorační, diuretické, antiflogistické vlastnosti (Mazol et al., 2004).



Obr. 15 **2-hydroxy-4-methoxybenzoová kyselina**

### **5.3 *Metabolismus flavonoidů***

Flavonoidy obsažené v potravě, jsou vstřebávány v tenkém střevě. Nejčastější typ absorpce flavonoidů je založena na rozštěpení glykosidické vazby. Dochází k uvolnění aglykonu za působení floridzin hydrolasy (LPH), která se nachází v epitelálních buňkách kartáčového lemu tenkého střeva. Uvolněný aglykon, díky své lipofilitě, může pomocí pasivní difúze projít přes stěnu epitelu tenkého střeva dále do krevního oběhu (Rio et al., 2013).

Druhou možností vstřebávání flavonoidů z tenkého střeva je za využití energie. Tato aktivní forma transportu glukosy je závislá na sodíku. Po vstupu do buňky dochází k hydrolýze buněčnými  $\beta$ -glukosidasami (Cassidy et al., 2017).

Před samotným průchodem aglykonů do krevního oběhu dochází, jak u pasivní tak aktivní formy, k metabolismu. Dojde k vytvoření sulfát glukuronidu a/nebo methylovaného metabolitu za působení sulfotransferasy (SULT), uridin-5-difosfátu glukuronosyltransferasy (UGT) a katechol-O-methyltransferasy (COMT).

Následně dochází k průchodu do krevního oběhu. Metabolity se dostávají do jater a zde dochází k dalším metabolismu. Část je poté vyloučena do žluče, následně do stolice a spolu s ní pryč z těla. Část se může pomocí enterohepatálního oběhu vrátit zpět do tenkého střeva (Rio et al., 2013).

Bylo zjištěno, že flavonoidy, které nejsou absorbovány v tenkém střevě mohou být metabolizovány až v oblasti tlustého střeva. Tam dochází díky mikroflóře ke štěpení na aglykon a fenolové kyseliny a ty jsou následně absorbovány. Byly prováděny studie, kde se zjišťovalo, které enzymy hydrolyzují flavonoidní glykosidy. Zjistilo se, že enzymy  $\beta$ -glukosidasa,  $\alpha$ -rhamnosidasa či  $\beta$ -galaktosidasa jsou schopny rozštěpit rutin na kvercetin (Aherne et al., 2002).

Byla prováděna studie s černým, zeleným čajem a citrusovými plody obsahujícími rutin. Všechny zmíněné vzorky obsahovali mimo jiné látky i flavonoidy. Výsledkem této studie bylo, že i přes poměrně malé vstřebávání flavonoidů z tlustého střeva, díky působení střevních bakterií, dochází vždy k metabolismu, až na malé fenolové kyseliny. Mezi fenolovými kyselinami byly i naše testované 3-hydroxybenzoová a 3,4-dihydroxybenzoová kyselina. Tyto fenolové kyseliny jsou dále vstřebávány do krve. Pouze jedna z testovaných kyselin vykazovala antiproliferační aktivitu u rakoviny prostaty, a to kyselina 3,4-dihydroxybenzoová, která by se do budoucna mohla jevit jako potenciální léčivo (Gao et al., 2006).

Studie prováděné na potkanech krmených špenátovými listy, obsahujícími kyselinu p-kumarovou, došla k závěru, že díky střevním bakteriím sídlícím v tlustém střevě, dochází ke štěpení na malé fenolové kyseliny. Mezi identifikovanými byla i naše kyselina 4-hydroxybenzoová (Rice-Evants et al., 2003).

Podobná studie, nejprve probíhající na potkanech a následně na lidech, se zeleným čajem poukazuje také na to, že při využití střevních bakterií v tlustém střevě dochází ke štěpení až na jednoduché fenolové kyseliny, včetně kyseliny benzoové (Rice-Evants et al., 2003).

Při bližším zkoumání *Prunus cerasus* (Rosaceae) *in vitro* i *in vivo* ve spojitosti s využitím obsahových látek anthokyaninů a jejich možném uplatnění při léčení zánětech střeva a rakovině střeva, došli až k izolaci degradačních produktů. Tyto produkty vznikly metabolizací v tlustém střevě. Mezi degradačními produkty byly identifikovány i malé fenolové kyseliny, mezi nimi i kyselina 2,4-dihydroxybenzoová (Seeram et al., 2001).

Při jiném výzkumu antokyaninů, kdy se zkoumal jejich potenciálně protektivní účinek na kardiovaskulární systém, ze stanovování vzorků ze séra, moči a stolici došlo k dalšímu potvrzení toho, že při metabolismu v tlustém střevě dochází k degradaci až na fenolové kyseliny, zde zmiňují mimo jiné i 2-hydroxy-4-methoxybenzoovou kyselinu (Ferrars et al., 2014).

Z výše uvedených studií, vyplývá, že díky střevním bakteriím v tlustém střevě a jejich metabolismu dochází k rozkladným produktům jakýchkoliv flavonoidů až na námi testované fenolové kyseliny. Tyto pak mohou být následně absorbovány a využity jako potenciální léčiva, ať již v oblasti pozitivních účinků kardiovaskulárních či antiproliferačních.

## 6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 6.1 Pomůcky

#### 6.1.1 Materiál

- 96 – jamková mikrotitrační destička (Brand)
- Automatické pipety o různých objemech (Brand)
- Vícekanálové pipety o různých objemech (Brand)

#### 6.1.2 Chemikálie

- Dimethylsulfoxid p.a. (DMSO), (Penta)
- Disodná sůl bathocuproindisulfonové kyseliny p.a. (BCS), (Sigma Aldrich)
- Hematoxylin p.a. (HEM), (Sigma Aldrich)
- Hydroxylamin hydrochlorid p.a. (HA), (Sigma Aldrich)
- Pentahydrát síranu měďnatého p.a. ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ), (Sigma Aldrich)
- 15mM acetátové pufrý – pH 4,5 a 5,5 (příprava: octová kyselina (Penta), octan sodný (Penta), ultračistá voda)
- 15mM HEPES pufrý – pH 6,8 a 7,5 (příprava: HEPES (Sigma Aldrich)
- HEPES sůl (Sigma Aldrich), ultračistá voda)
- Testované látky – benzoová kyselina p.a., 3-hydroxybenzoová kyselina p.a., 4-hydroxybenzoová kyselina p.a., 3,4-dihydroxybenzoová kyselina p.a., 2,4-dihydroxybenzoová kyselina p.a. a 2-hydroxy-3-methoxy benzoová kyselina p.a., (Sigma Aldrich)

### 6.1.3 Přístrojové vybavení

- Analytické váhy KERN ABT120-5DM
- Spektrofotometr pro mikrotitrační destičky SYNERGY HIT Multi-Detection Microplate Reader (BioTec Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)
- Třepačka pro mikrotitrační destičky IKA®MS 3 digital
- Třepačka pro zkumavky IKA®VORTEX GENIUS 3

## 6.2 Příprava roztoků

### 6.2.1 Příprava zásobních roztoků

- Disodná sůl bathocuproindisulfonové kyseliny (BCS) – 5 mM roztok byl připravený rozpuštěním příslušného množství BCS v destilované vodě
  - $M_w$  (BCS) = 564,54 g/mol
- Hematoxylin (HEM) – 5 mM roztok v DMSO
  - $M_w$  (HEM) = 302,28 g/mol (stabilní je po dobu cca 5 hodin)
- Hydroxylamin hydrochlorid (HA) – 100 mM roztok byl připravený rozpuštěním příslušného množství HA v destilované vodě
  - $M_w$  (HA) = 69,49 g/mol
- Měďnaté ionty ( $\text{Cu}^{2+}$ ) – 5 mM roztok  $\text{Cu}^{2+}$  byl připravený rozpuštěním příslušného množství pentahydrátu síranu měďnatého ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) v destilované vodě
  - $M_w$  ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) = 249,69 g/mol
- Měďné ionty ( $\text{Cu}^+$ ) – 5 mM roztok  $\text{Cu}^+$  byl připravený rozpuštěním příslušného množství chloridu měďného ( $\text{CuCl}$ ) ve vodném roztoku 0,1 M kyseliny chlorovodíkové ( $\text{HCl}$ ) a 1 M chloridu sodného ( $\text{NaCl}$ )
  - $M_w$  ( $\text{CuCl}$ ) = 98,99 g/mol
- Pufry – roztoky pufrů byly připraveny z octanu sodného a kyseliny octové při pH 4,5 a 5,5 a z HEPES, HEPES sodium salt při pH 6,8 a 7,5

### 6.2.2 Příprava pracovních roztoků

- Hydroxylamin hydrochlorid (HA) – 1 mM a 10 mM roztok HA v destilované vodě
- Hematoxylin (HEM) - 250  $\mu$ M roztoku v DMSO (stabilní pouze 90 minut)
- Ionty mědi  $\text{Cu}^+$  a  $\text{Cu}^{2+}$  - 250  $\mu$ M roztoky v DMSO / destilované  $\text{H}_2\text{O}$
- Testované látky – základní roztok obvykle 10 mM v DMSO, další ředění v DMSO podle potřeby

## 6.3 Všeobecné postupy

### 6.3.1 Kalibrační křivka

Do všech připravených jamek mikrotitrační destičky jsme napipetovali 150 $\mu$ l pufru o pH 6,8. Přidali jsme 50 $\mu$ l 1mM roztoku hydroxylamin hydrochloridu. Napipetovali jsme 50 $\mu$ l roztoku měďnatých iontů požadované koncentrace do **testovacích jamek** a 50 $\mu$ l destilované vody do **kontrolních jamek**. Poté jsme dali mikrotitrační destičku na třepací aparát a nechali jsme míchat 1 minutu. Následně jsme přidali 50 $\mu$ l disodné soli bathocuproindisulfonové kyseliny přesně do poloviny jamek (**X**) a do druhé poloviny dáme 50 $\mu$ l destilované vody (**X**). Hned poté jsme měřili absorbanci při vlnové délce 484nm a následně po 5 minutách, respektivně po 4:30 minutách od naměření prvních hodnot.

A	B	C	D	E	
X	X	X	X	X	jamky s indikátorem
X	X	X	X	X	
X	X	X	X	X	slepé vzorky
X	X	X	X	X	

Obr. 16 Schéma mikrotitrační destičky

#### Vysvětlivky

- A – roztok testované látky o požadované koncentraci  $c_1$
- B – roztok testované látky o požadované koncentraci  $c_2$
- C – roztok testované látky o požadované koncentraci  $c_3$
- D – roztok testované látky o požadované koncentraci  $c_x$
- E – kontrolní jamky o požadované koncentraci ( $c = 0$ )

### Konečný obsah jamky

- 150  $\mu\text{l}$  pufru
- 50  $\mu\text{l}$  roztoku  $\text{Cu}^{2+}$
- 50  $\mu\text{l}$  roztok testované látky nebo rozpouštědlo
- 50  $\mu\text{l}$  roztoku BCS nebo  $\text{H}_2\text{O}$

### 6.3.2 Zkouška základních roztoků iontů mědi

Připravili jsme si základní roztoky o koncentraci 5mM Cu<sup>+</sup> a Cu<sup>2+</sup>. Před prvním použitím bylo nutné provést zkoušku základních roztoků. Můžeme je uchovávat v lednici, jsou stabilní, před dalším použitím není potřeba provádět kontrolu znova.

Připravili jsme si mikrotitrační destičku, pipetovali jsme pouze do dvou jamek. Napipetovali jsme si 150μl pufru o pH 7,5. Následně jsme přidali 50μl roztoku hydroxylaminu hydrochloridu 1 mM a 50μl roztoků iontů mědi o koncentraci 0,25mM. Roztok iontů mědi jsme si připravili z 950μl čištěné vody a 50μl základního roztoku. Mikrotitrační destičku jsme dali na třepačku a ponechali třepat 1 minutu. Poté jsme přidali 50μl 5mM roztoku BSC. Po uplynutí 1 minuty jsme měřili absorbanci při 484nm. Absorbance správně připraveného roztoku iontů mědi by měla být okolo **0,50 – 0,55**.

### 6.3.3 Stanovení chelatace iontů mědi *hematoxylinem*

Do potřebných jamek mikrotitrační destičky jsme si napipetovali příslušný pufr o pH 7.5, 6.8 nebo 5.5 v objemu 150μl a k němu jsme přidali 50μl 250μM roztoku Cu<sup>2+</sup> iontů . Následně jsme přidali do **testovacích jamek** 50μl roztoku testované látky o příslušné koncentraci. Do **kontrolních jamek** jsme přidali 50μl rozpouštědla. Mikrotitrační destičku jsme dali na 2 minuty míchat na třepačku. Posléze se přidalo 50μl 250μM hematoxylinu do první poloviny jamek (tj. do prvních dvou řad) (**X**) nebo **DMSO** do druhé poloviny jamek (**X**) (DMSO se pipetuje jako první). Opět jsme promíchali na třepačku. Celý obsah se míchal 3 minuty. Měřili jsme absorbanci při 610nm pro pH 7,5 či 590nm pro pH 6,8 nebo 595 pro pH 5,5 ihned tzn. v čase 3 minuty po domíchání a druhé měření v čase 7 minut.

Roztok testované látky c <sub>1</sub>	Roztok testované látky c <sub>2</sub>	Roztok testované látky c <sub>3</sub>	Roztok testované látky c <sub>x</sub>	Kontrolní jamky (c = 0) / DMSO	
X	X	X	X	X	jamky s indikátorem
X	X	X	X	X	
X	X	X	X	X	slepé vzorky
X	X	X	X	X	

Obr. 17 Stanovení chelatace měďnatých iontů hematoxylinem

Konečný obsah jamky

- 150 µl pufr
- 50 µl roztok Cu<sup>2+</sup>
- 50 µl roztok testované látky nebo rozpouštědlo
- 50 µl roztok HEM nebo DMSO

### 6.3.4 Chelatace měďnatých ( $\text{Cu}^{2+}$ ) iontů v pufru (pH 4.5, 5.5, 6.8, 7.5)

Do potřebných jamek mikrotitrační destičky jsme si napipetovali příslušný pufr v objemu 100 $\mu\text{l}$ . Následně jsme přidali do **testovacích jamek** 50 $\mu\text{l}$  roztoku testované látky o příslušné koncentraci. Do **kontrolních jamek** jsme přidali 50 $\mu\text{l}$  rozpouštědla v našem případě DMSO. Posléze se přidalo 50 $\mu\text{l}$  250 $\mu\text{M}$  roztoku  $\text{Cu}^{2+}$  iontů v roztoku DMSO do všech jamek a destička byla dána na třepačku míchat na 2 minuty. Po dvou minutách jsme přidali 50 $\mu\text{l}$  1mM roztok hydroxylamin hydrochloridu pro pH 6.8 a 7.5 a 10mM roztok hydroxylamin hydrochloridu pro pH 4.5 a 5.5, vše jsme dali opět na třepačku a nechali třepat 1 minutu. Nakonec jsme přidali 50 $\mu\text{l}$  5mM **BCS (X)** nebo **vody (X)** (voda se pipetuje jako první). Měřili jsme absorpenci při 484nm ihned po napipetování a následně po 5 minutách (druhé měření se spouští v čase 4 minuty a 30 sekund).

#### Vysvětlivky

- A – roztok testované látky o požadované koncentraci  $c_1$
- B – roztok testované látky o požadované koncentraci  $c_2$
- C – roztok testované látky o požadované koncentraci  $c_3$
- D – roztok testované látky o požadované koncentraci  $c_x$
- E – kontrolní jamky o požadované koncentraci ( $c = 0$ )

A	B	C	D	E
X	X	X	X	X
X	X	X	X	X
X	X	X	X	X
X	X	X	X	X

jamky s indikátorem

slepé vzorky

Obr. 18 Schéma mikrotitrační destičky

Konečný obsah jamky

- 100  $\mu$ l pufru
- 50  $\mu$ l roztoku testované látky nebo rozpouštědlo (DMSO)
- 50  $\mu$ l 250  $\mu$ l roztoku  $\text{Cu}^{2+}$  v DMSO
- 50  $\mu$ l roztoku HA (1 mM / 10 mM)
- 50  $\mu$ l 5mM roztoku BCS nebo vody

### 6.3.5 Chelatace měďných ( $\text{Cu}^+$ ) iontů v pufru (pH 4.5, 5.5, 6.8, 7.5)

Do potřebných jamek mikrotitrační destičky jsme si napipetovali příslušný pufr v objemu 100 $\mu\text{l}$ . Následně jsme přidali 50 $\mu\text{l}$  roztoku hydroxylaminu hydrochloridu 1mM pro pH 6,8 a 7,5 a 10mM pro pH 4,5 a 5,5. Přidali jsme 50 $\mu\text{l}$  250 $\mu\text{l}$  roztoku  $\text{Cu}^+$  iontů v roztoku DMSO do všech jamek a nechali jsme míchat 1 minutu na třepačce. Po domíchání jsme přidali do **testovacích jamek** 50 $\mu\text{l}$  roztoku příslušného vzorku o příslušné koncentraci. Do **kontrolních jamek** jsme přidali 50 $\mu\text{l}$  daného rozpouštědla. Nechali jsme promíchat na třepačce přesně 2 minuty. Nakonec jsme přidali 50 $\mu\text{l}$  5mM roztoku disodné soli bathocuproindisulfonové kyseliny (X) nebo vody (X). Měřili jsme absorbanci při 484nm ihned a po 5 minutách (druhé měření se spouští v čase 4 minuty a 30 sekund).

#### Vysvětlivky

- A – roztok testované látky o požadované koncentraci  $c_1$
- B – roztok testované látky o požadované koncentraci  $c_2$
- C – roztok testované látky o požadované koncentraci  $c_3$
- D – roztok testované látky o požadované koncentraci  $c_x$
- E – kontrolní jamky o požadované koncentraci ( $c = 0$ )

A	B	C	D	E	
X	X	X	X	X	jamky s indikátorem
X	X	X	X	X	
X	X	X	X	X	slepé vzorky
X	X	X	X	X	

Obr. 19 Schéma mikrotitrační destičky

Konečný obsah jamky

- 100  $\mu$ l pufru
- 50  $\mu$ l roztoku testované látky nebo rozpouštědlo (DMSO)
- 50  $\mu$ l 250  $\mu$ l roztoku  $\text{Cu}^+$  v DMSO
- 50  $\mu$ l roztoku HA (1 mM / 10 mM)
- 50  $\mu$ l 5mM roztoku BCS nebo vody

### 6.3.6 Statistická analýza

Množství zbylé mědi bylo vypočítáno z rozdílu absorbance mezi testovanou látkou (vzorku s indikátorem) a slepého vzorku (vzorku bez indikátoru), vydělené rozdílem kontrolovaného vzorku (známého množství mědi bez testované látky) a slepého vzorku.

Na statistickou analýzu byl použitý program MS Exel a GraphPad Prism verze 7 pro Windows (GraphPad Software, USA). Při porovnávání schopností jednotlivých vzorků chelatace byl použitý test ANOVA s Bonferroniho post testem. Všechny křivky použité v rigorózní práci byly sestavené z nejméně pěti bodů, od 0 po 100 % chelatace.

Výsledky byly zpracované jako průměr  $\pm$  směrodatné odchylky vypočítané podle

vzorce

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

$\bar{x}$  .....střední hodnota vzorku

$n$  .....velikost vzorku

## 7. VÝSLEDKY

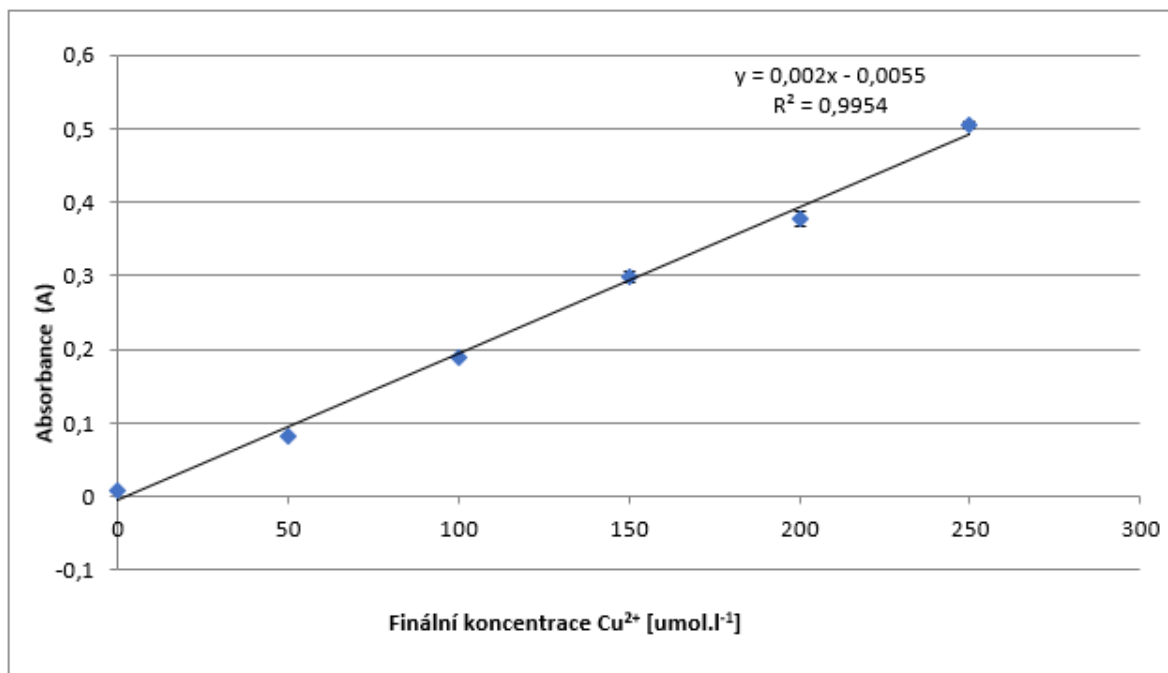
### 7.1 Kalibrační křivka

Do všech připravených jamek mikrotitrační destičky jsme napipetovali 150 $\mu$ l pufru o pH 6,8. Přidali jsme 50 $\mu$ l 1mM roztoku hydroxylamin hydrochloridu. Napipetovali jsme 50 $\mu$ l roztoku měďnatých iontů požadované koncentrace do **testovacích jamek** a 50 $\mu$ l destilované vody do **kontrolních jamek**. Poté jsme mikrotitrační destičku dali na třepací aprát a nechali jsme míchat 1 minutu. Následně jsme přidali 50 $\mu$ l disodné soli bathocuproindisulfonové kyseliny přesně do poloviny jamek (X) a do druhé poloviny jsme přidali 50 $\mu$ l destilované vody (X). Hned poté jsme měřili absorbanci při vlnové délce 484nm a následně po 5 minutách, respektivně po 4:30 minutách od naměření prvních hodnot.

Z naměřených hodnot absorbancí v čase 5 minut (tabulka 1) byl sestaven graf kalibrační křivky. Byly použité následující koncentrace měďnatých iontů: 0 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M, 150 $\mu$ M, 200 $\mu$ M a 250 $\mu$ M (obr. 19). Závislost absorbance na koncentraci měďnatých iontů je lineární (obr. 20).

pH 68	5 min					
zakladni c / $\mu$ M/	0	50	100	150	200	250
výsledná c / $\mu$ M/	0	8,333333	16,66667	25	33,33333	41,66667
A + bathocuproin	0,04	0,111	0,218	0,322	0,404	0,534
	0,036	0,116	0,223	0,337	0,421	0,546
A - bathocuproin	0,03	0,03	0,031	0,031	0,04	0,033
	0,03	0,033	0,034	0,031	0,031	0,037
A rozdíl	0,01	0,0795	0,1855	0,291	0,3685	0,499
	0,006	0,0845	0,1905	0,306	0,3855	0,511
průměr	0,008	0,082	0,188	0,2985	0,377	0,505
SD	0,002	0,0025	0,0025	0,0075	0,0085	0,006

Tab. 1 Naměřené hodnoty absorbance v čase 5 minut





Obr. 20 Kalibrační křivka měďnatých iontů v čase 5 minut


Kontrola c (Cu <sup>2+</sup> ) = 0 μM	Kontrola c (Cu <sup>2+</sup> ) = 50 μM	Kontrola c (Cu <sup>2+</sup> ) = 100 μM	Kontrola c (Cu <sup>2+</sup> ) = 150 μM	Kontrola c (Cu <sup>2+</sup> ) = 200 μM	Kontrola c (Cu <sup>2+</sup> ) = 250 μM
X	X	X	X	X	X
X	X	X	X	X	X
X	X	X	X	X	X
X	X	X	X	X	X

Obr. 21 Schéma mikrotitrační destičky při stanovení chelatace Cu<sup>2+</sup> iontů

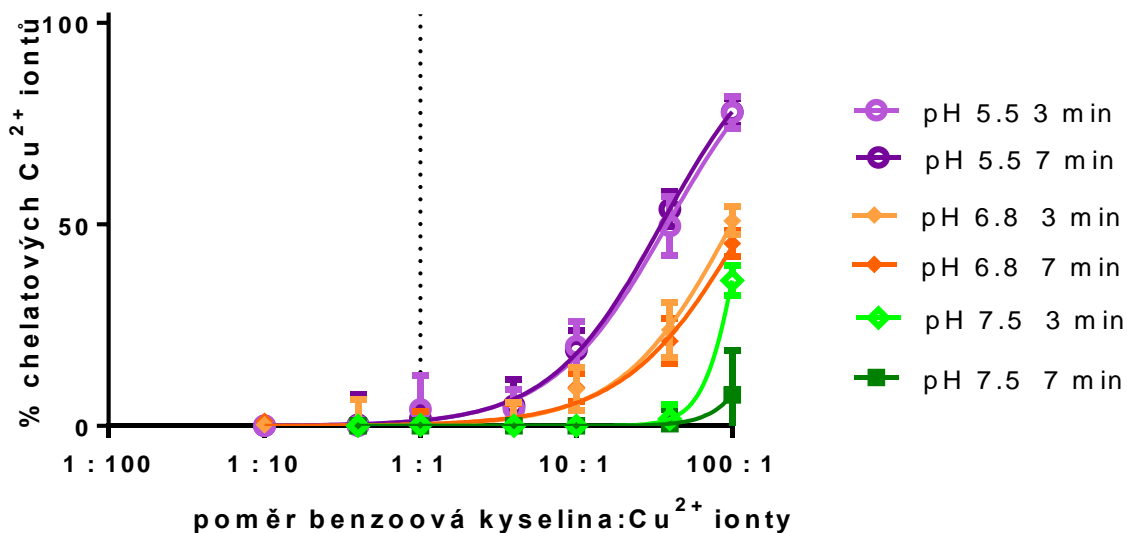
 Roztok testované látky c<sub>1</sub> - c<sub>x</sub>

 Kontrolní jamky c = 0

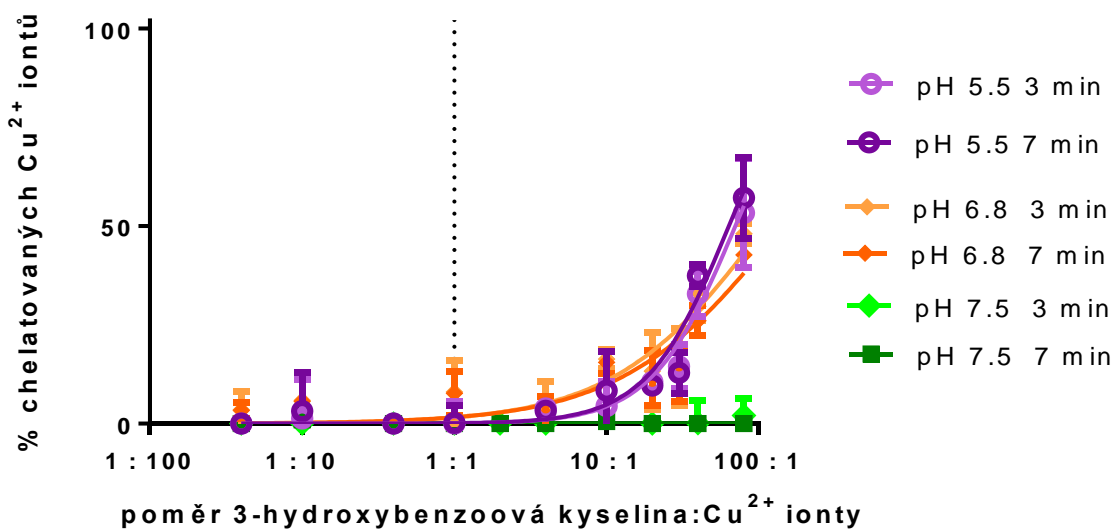
 slepé vzorky

 jamky s indikátorem

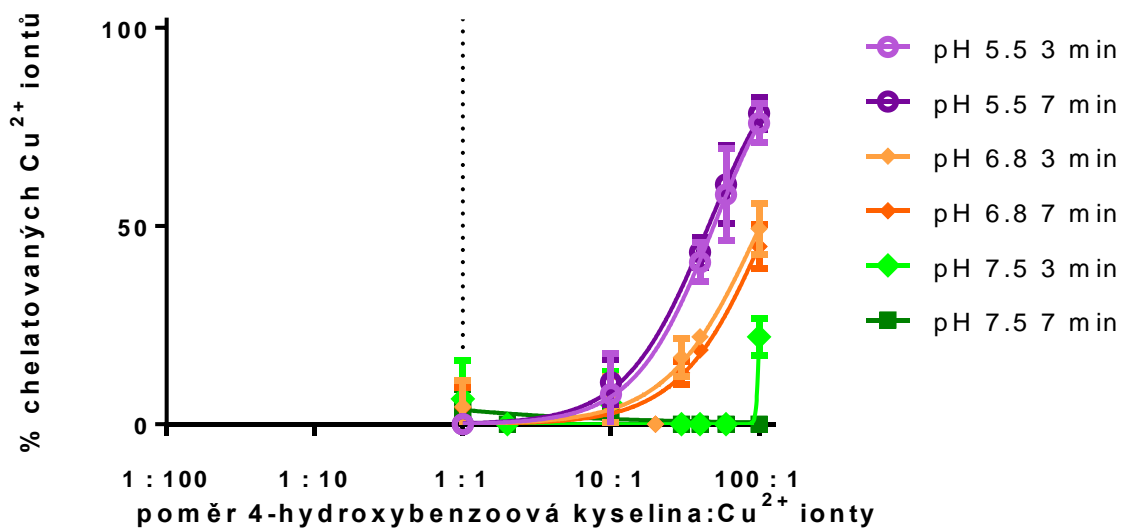
## 7.2 Chelatace měďnatých iontů vybranými benzoovými kyselinami za použití hematoxylinu



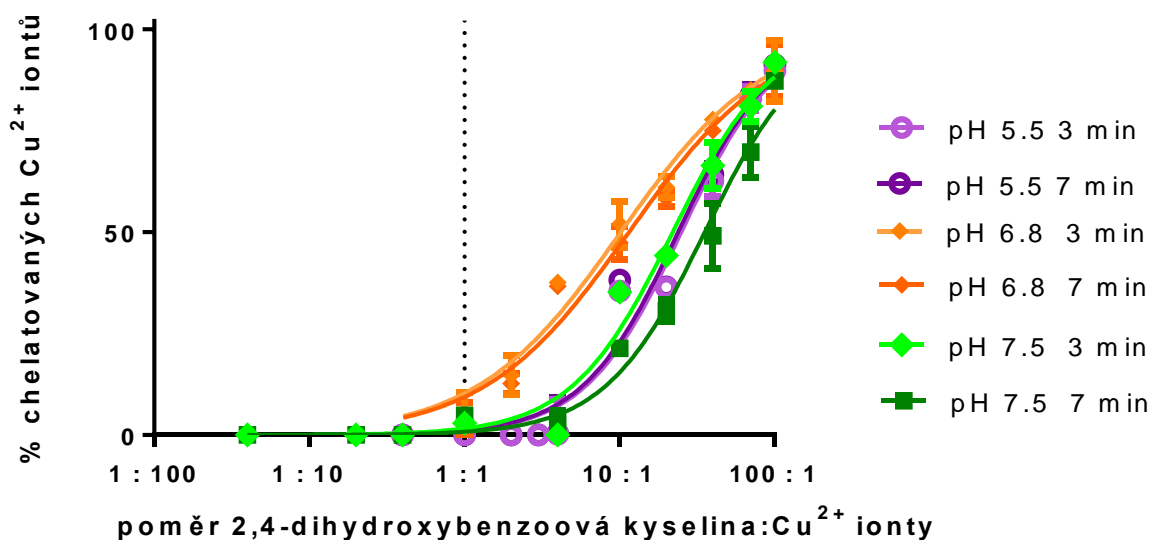
Obr. 22 Chelatace  $\text{Cu}^{2+}$  iontů hematoxylinem při různých hodnotách pH: kyselina benzoová



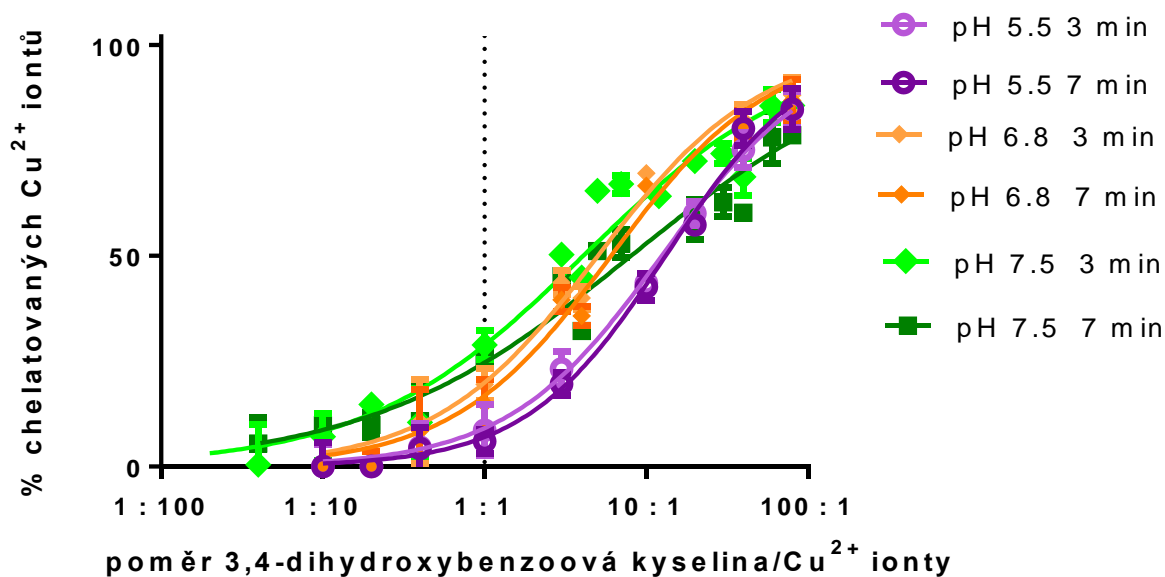
Obr. 23 Chelatace  $\text{Cu}^{2+}$  iontů hematoxylinem při různých hodnotách pH: kyselina 3-hydroxybenzoová



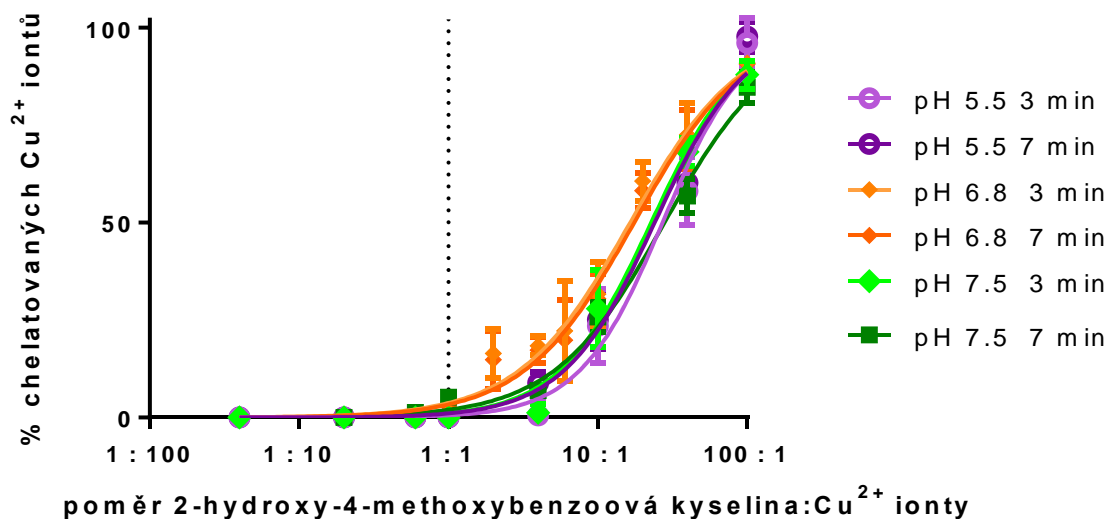
Obr. 24 Chelatace  $\text{Cu}^{2+}$  iontů hematoxylinem při různých hodnotách pH: kyselina 4-hydroxybenzoová



Obr. 25 Chelatace  $\text{Cu}^{2+}$  iontů hematoxylinem při různých hodnotách pH: kyselina 2,4-dihydroxybenzoová

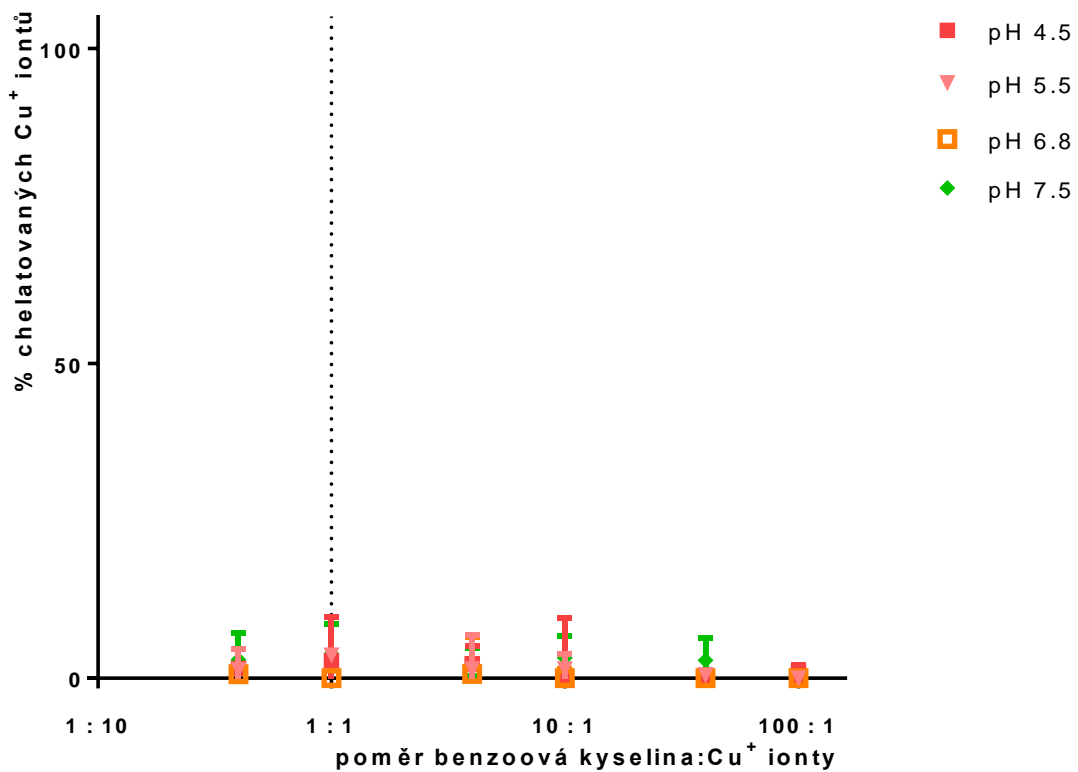


Obr. 26 Chelatace  $\text{Cu}^{2+}$  iontů hematoxylinem při různých hodnotách pH: kyselina 3,4-dihydroxybenzoová

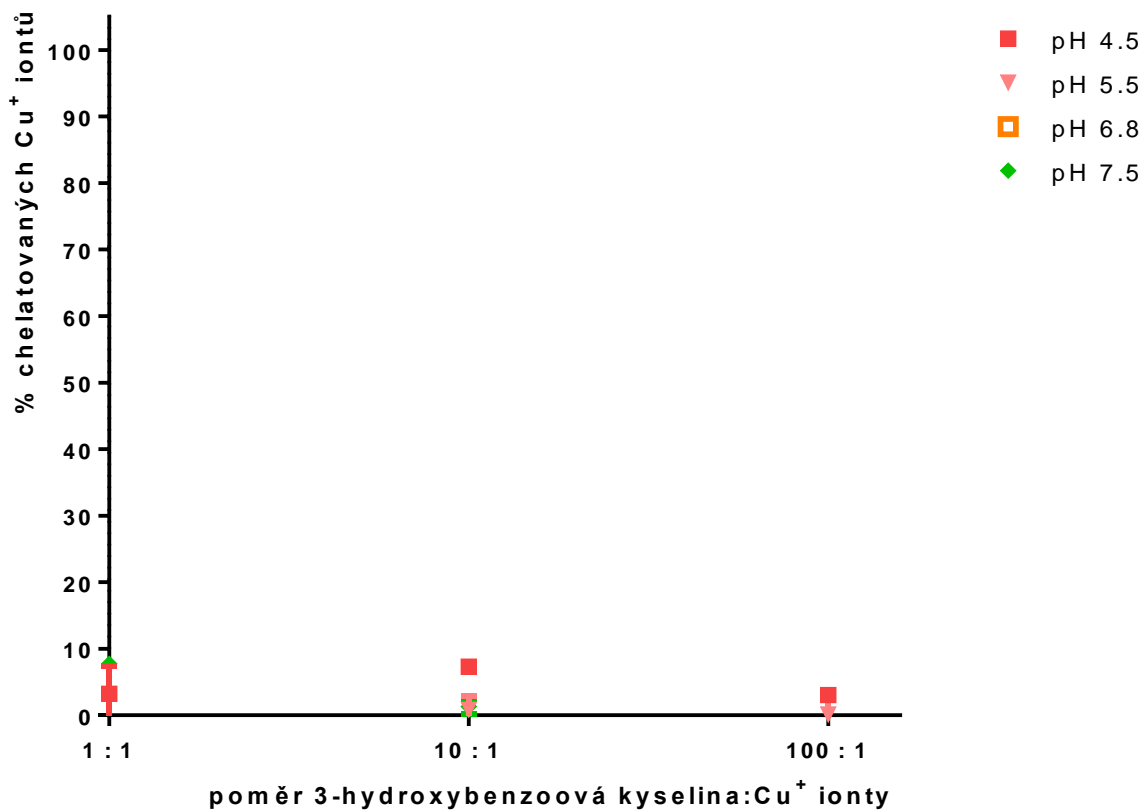


Obr. 27 Chelatace  $\text{Cu}^{2+}$  iontů hematoxylinem při různých hodnotách pH: kyselina 2-hydroxy-4-methoxybenzoová

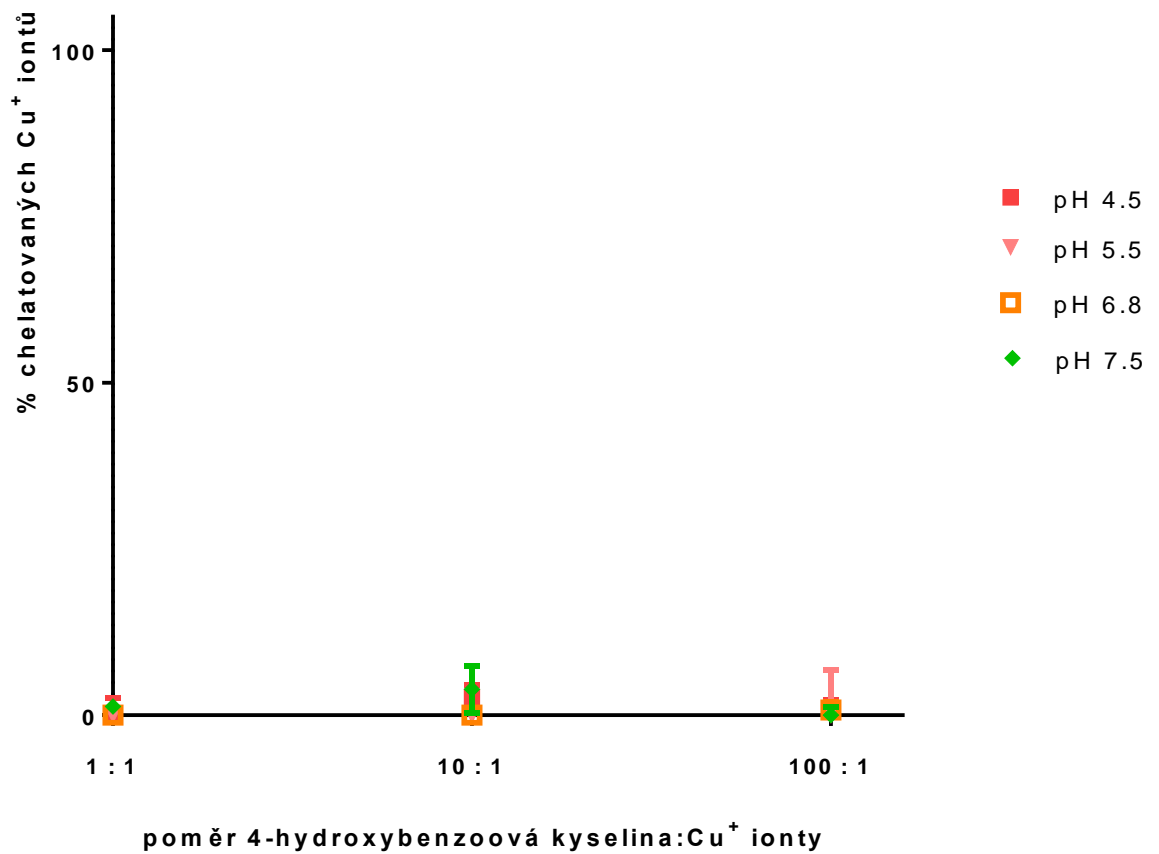
### 7.3 Chelatace $\text{Cu}^+$ iontů bathokuproinem při poměru benzoových kyselin a měďných iontů při různých hodnotách pH



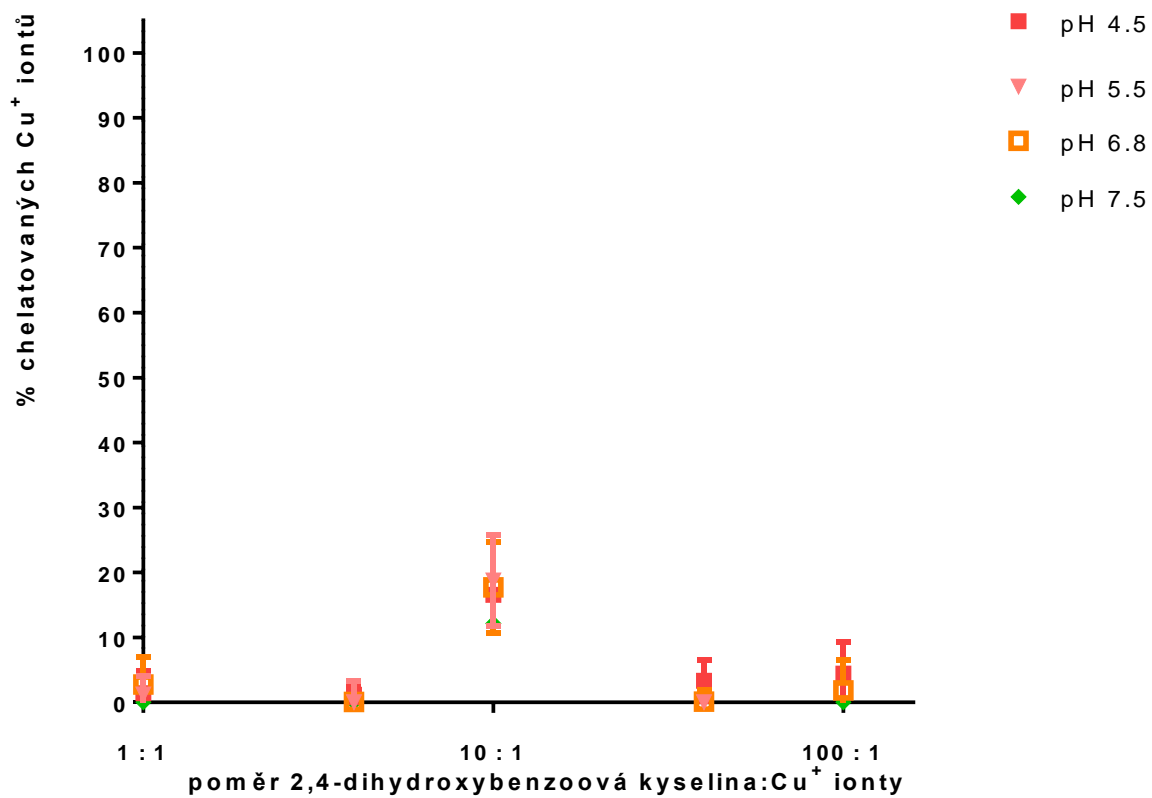
Obr. 28 Schopnost benzoové kyseliny chelatovat  $\text{Cu}^+$  ionty v čase 5 minut od přidání indikátoru



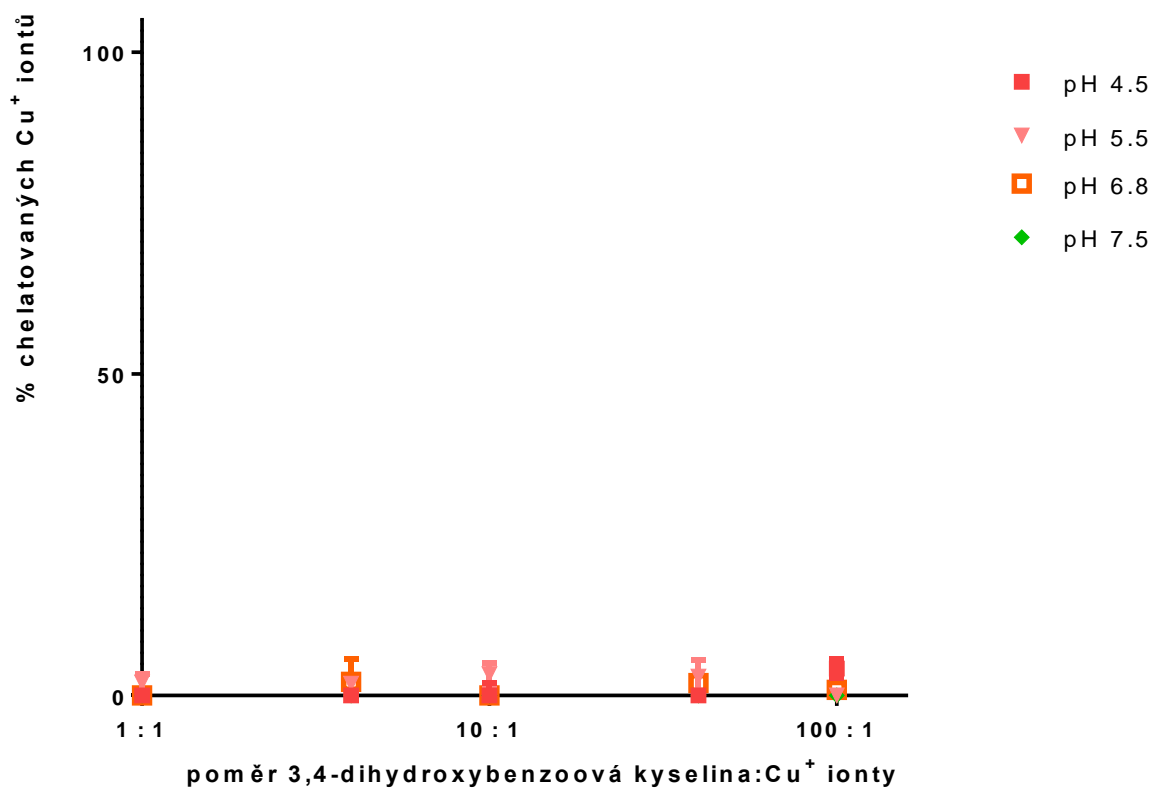
Obr. 29 Schopnost 3-hydroxybenzoové kyseliny chelatovat Cu<sup>+</sup> ionty v čase 5 minut od přidání indikátoru



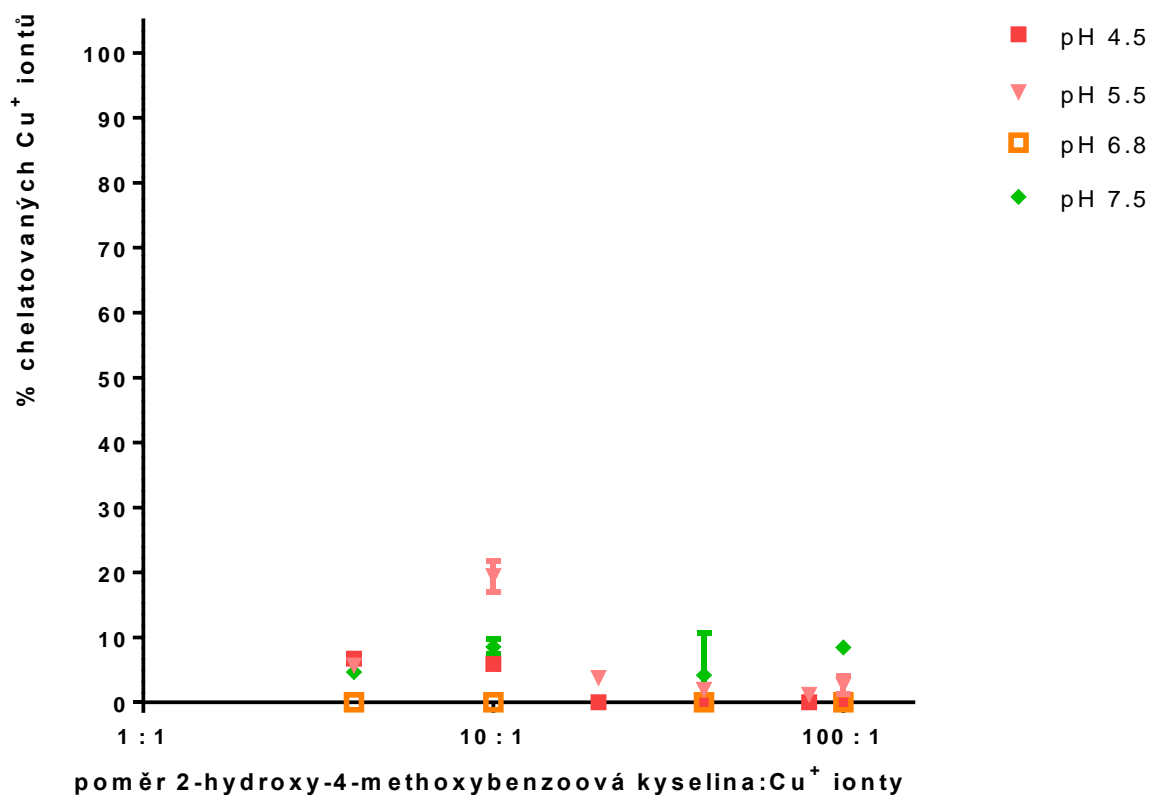
Obr. 30 Schopnost 4-hydroxybenzoové kyseliny chelatovat Cu<sup>+</sup> ionty v čase 5 minut od přidání indikátoru



Obr. 31 Schopnost 2,4-dihydroxybenzoové kyseliny chelatovat Cu<sup>+</sup> ionty v čase 5 minut od přidání indikátoru

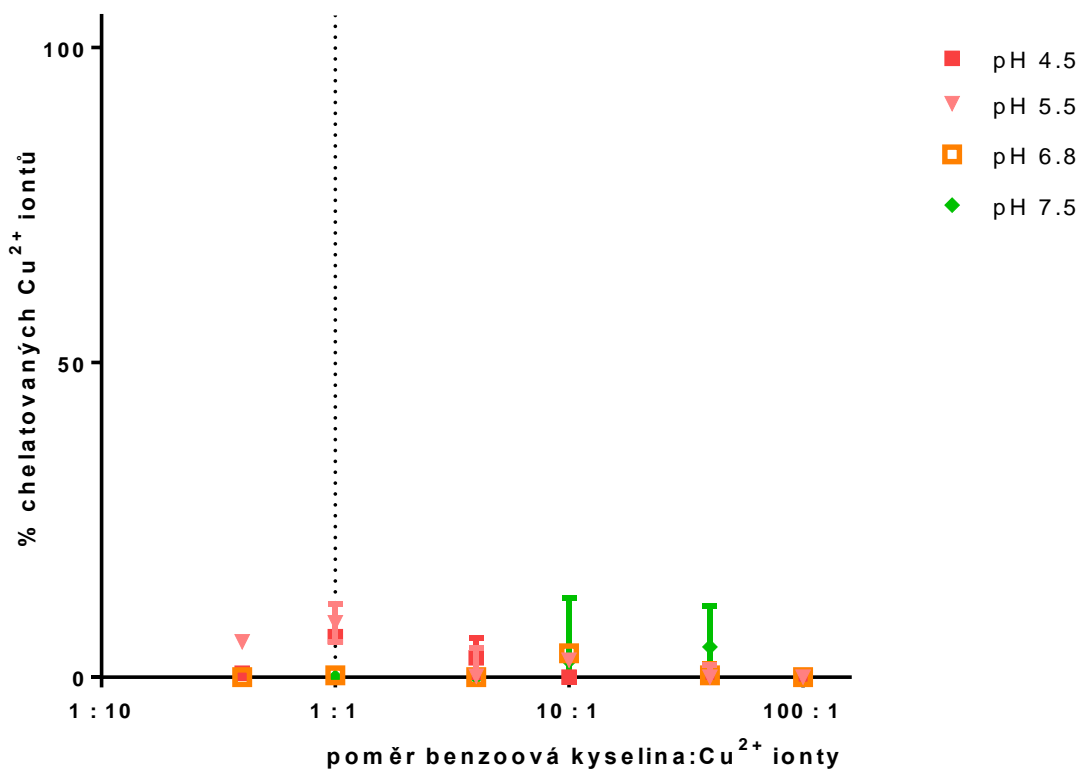


Obr. 32 Schopnost 3,4-dihydroxybenzoové kyseliny chelatovat Cu<sup>+</sup> ionty v čase 5 minut od přidání indikátoru

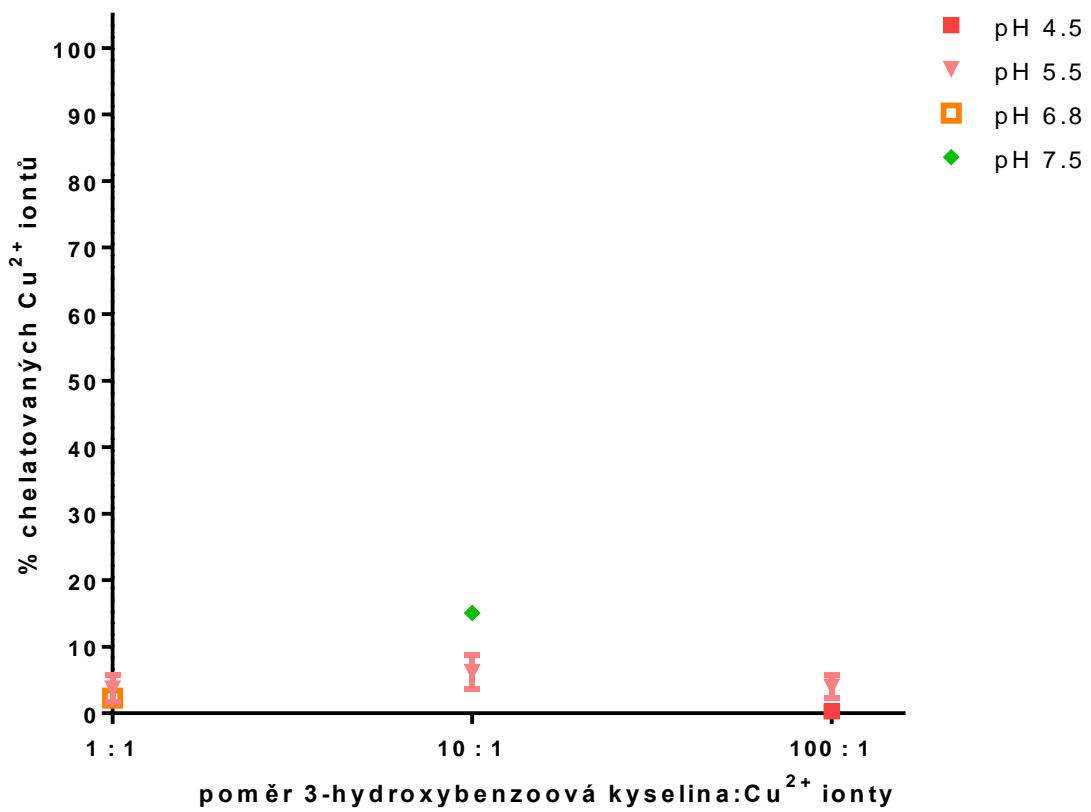


Obr. 33 Schopnost 2-hydroxy-4-methoxybenzoové kyseliny chelatovat Cu<sup>+</sup> ionty v čase 5 minut od přidání indikátoru

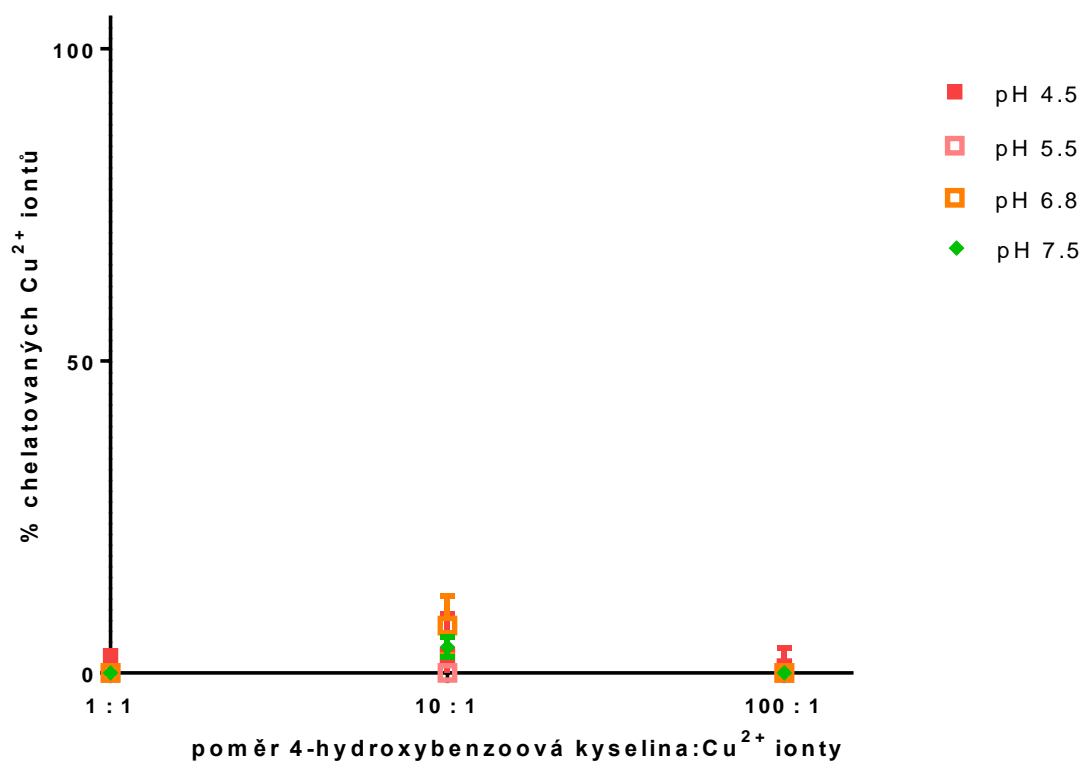
#### 7.4 Chelatace $\text{Cu}^{2+}$ iontů bathokuproinem při poměru benzoových kyselin a měďnatých iontů při různých hodnotách pH



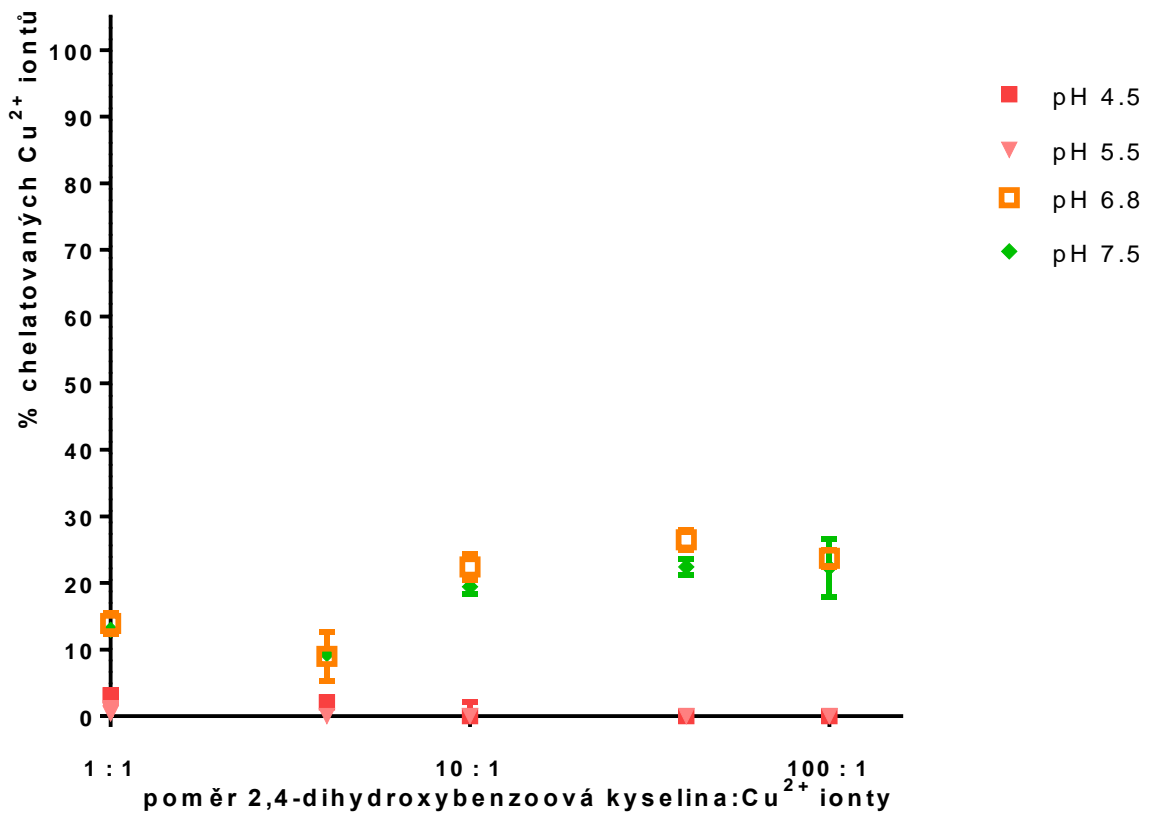
Obr. 34 Schopnost benzoové kyseliny chelatovat  $\text{Cu}^{2+}$  ionty v čase 5 minut od přidání indikátoru



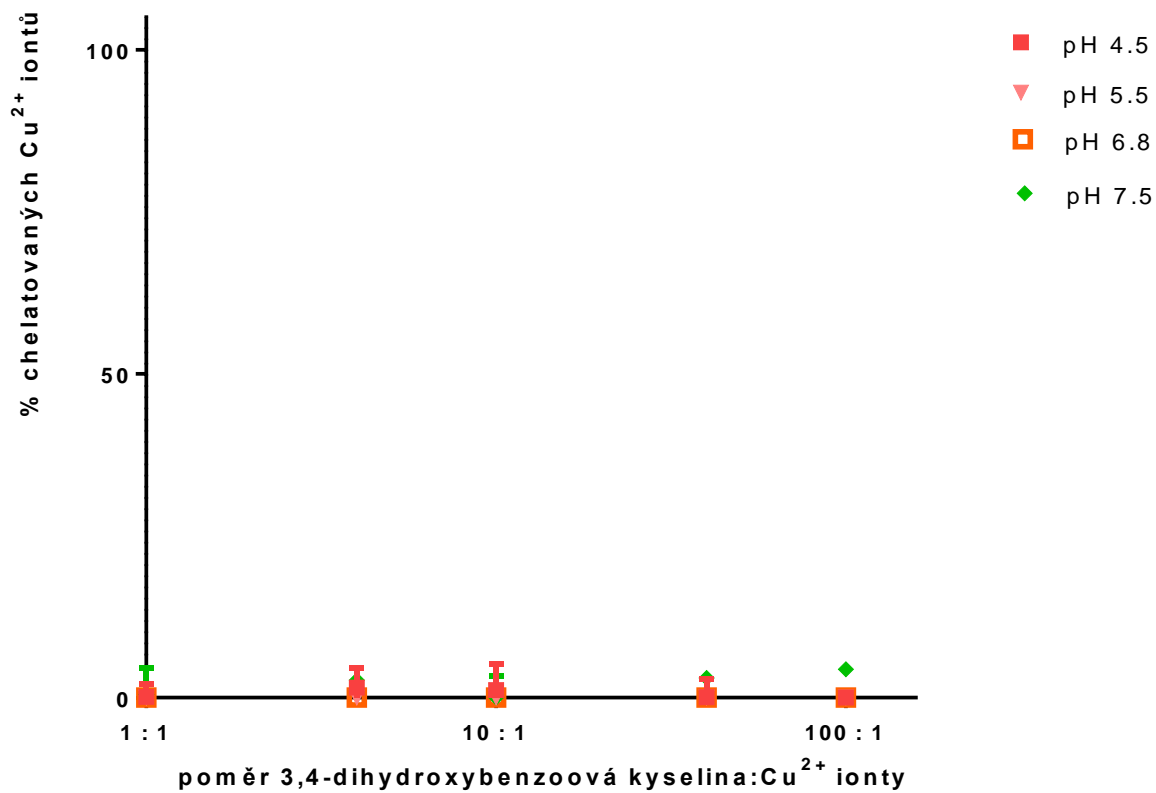
Obr. 35 Schopnost 3-hydroxybenzoové kyseliny chelatovat Cu<sup>2+</sup> ionty v čase 5 minut od přidání indikátoru



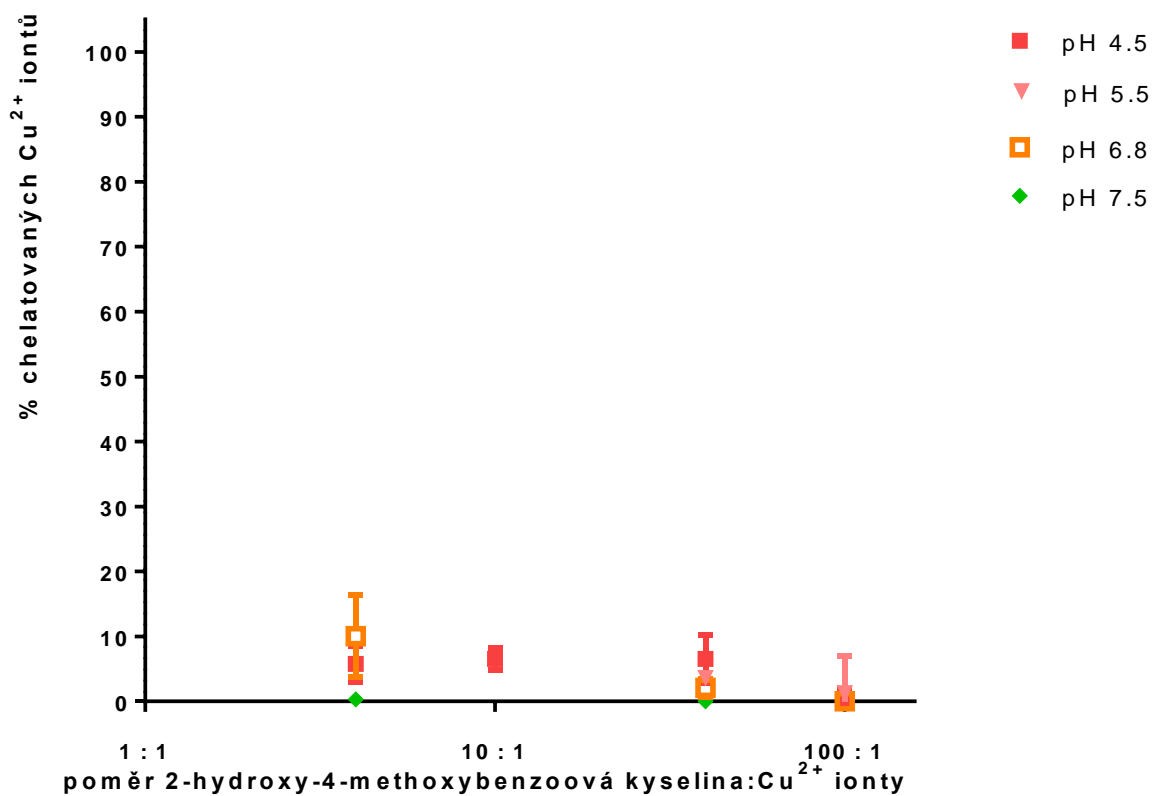
Obr. 36 Schopnost 4-hydroxybenzoové kyseliny chelatovat Cu<sup>2+</sup> ionty v čase 5 minut od přidání indikátoru



Obr. 37 Schopnost 2,4-dihydroxybenzoové kyseliny chelatovat Cu<sup>2+</sup> ionty v čase 5 minut od přidání indikátoru



Obr. 38 Schopnost 3,4-dihydroxybenzoové kyseliny chelatovat Cu<sup>2+</sup> ionty v čase 5 minut od přidání indikátoru



Obr. 39 Schopnost 2-hydroxy-4-methoxybenzoové kyseliny chelatovat Cu<sup>2+</sup> ionty v čase 5 minut od přidání indikátoru

## 8. DISKUZE A ZÁVĚR

Kyselina benzoová a od ní odvozené kyseliny s celou řadou dalších látek patří do skupiny fenolových sloučenin. Byly prokázány jejich pozitivní účinky na lidský organismus. Vysoký příjem potravin bohatých na tyto látky je spojený se snížením rizika vzniku běžných degenerativních a chronických onemocnění způsobených oxidačním stresem (Zhang et al., 2016).

Další látky patřící do skupiny fenolových sloučenin jsou flavonoidy. Jejich antioxidačních, antimikrobiálních, protizánětlivých či hepatoprotektivních vlastností se dá využít při léčbě různých onemocněních (Říha et al., 2014).

Téměř skoro všechny flavonoidy vykazují měď-chelatační aktivitu. Nejvyšší chelatační aktivita se projevila u flavonoidů, které obsahovaly hydroxylovou skupinu v poloze 3 v kombinaci s keto skupinou v poloze 4 a dvojnou vazbou v poloze 2-3 (kemferol, 3-hydroxyflavon) zejména při nižších pH. Zajímavé je, že některé látky např. 3-hydroxyflavon, kemferol a částečně i baikalein vykazují ještě vyšší měď-chelatační aktivitu než chelátor mědi trientin, zejména v kyselém prostředí (Říha et al., 2014).

Cílem této rigorózní práce bylo zjistit měď-chelatační schopnost šesti kyselin odvozených od kyseliny benzoové. Konkrétně se jednalo o kyselinu benzoovou, 3-hydroxybenzoovou kyselinu, 4-hydroxybenzoovou kyselinu, 2,4-dihydroxybenzoovou kyselinu, 3,4-dihydroxybenzoovou kyselinu a 2-hydroxy-4-methoxybenzoovou kyselinu. Měď-chelatační aktivita byla testována při různých pH pomocí dvou spektrofotometrických metod, kdy v první metodě byl použit jako indikátor hematoxylin (HEM) a v druhé disodná sůl bathokproindisulfonové kyseliny (BCS, bathokuproin).

Měď-chelatační aktivity těchto kyselin byly vyhodnoceny na základě vytvoření komplexu mezi  $\text{Cu}^+$  /  $\text{Cu}^{2+}$  ionty a HEM či BCS.

Nejprve se u vybraných kyselin stanovovala měď-chelatační aktivita za použití hematoxylinu, což byl indikátor. Hematoxylin vytváří s ionty mědi komplexy, které jsou v porovnání s BCS méně stabilní. Stanovení  $\text{Cu}^{2+}$  iontů s hematoxylinem se stanovovalo při pH 5.5, 6.8 a 7.5 (Říha et al., 2013).

Naměřené výsledky při stanovení s hematoxylinem ukázaly, že téměř všechny testované benzoové kyseliny chelatovaly  $\text{Cu}^{2+}$  ionty až při vyšších koncentracích, což je zobrazeno na obr. 22-27 (str. 51-53). Nejvyšší chelatační aktivita je patrná u 2,4-dihydroxybenzoové kyseliny (obr. 25, str. 52), 3,4-dihydroxybenzoové kyseliny (obr. 26, str. 53) a 2-hydroxy-4-methoxybenzoové kyseliny (obr. 27, str. 53), kde měď-chelatační aktivita dosahuje téměř 90 %, avšak až ve vyšších koncentracích. U kyseliny benzoové (obr. 22, str. 51), kyseliny 3-hydroxybenzoové (obr. 23, str. 51), 4-hydroxybenzoové (obr. 24, str. 52) bylo dosaženo nižších hodnot chelatační aktivity a zajímavé je, že při pH 7,5 téměř nechelatovaly.

Oproti tomu měď-chelatační stanovení s indikátorem BSC u vybraných kyselin ukázalo, že žádná z testovaných látek nebyla schopna chelatovat ionty mědi z více jak 20 %. Kyselina 2,4-dihydroxybenzoová (viz obr. 31, str. 57) vykazovala své měď-chelatační schopnosti s měďnými ionty, a to pouze v poměru 10:1 při pH 5,5 a 6,8. Chelatační aktivita zde byla 20 %. U jiných pH tato kyselina měď-chelatační aktivitu nevykazovala. Měď-chelatační aktivita s měďnými ionty byla pozorována i u kyseliny 2-hydroxy-4-methoxybenzoové (obr. 33, str. 59), kde nejvýrazněji měď-chelatační aktivita s měďnými ionty byla v poměru 10:1 při pH 5,5 a to 20 %. Při pH 7,5 a 4,5 byla pozorována slabá měď-chelatační aktivita kolem 10 %. Kyselina benzoová (obr. 28, str. 54), kyselina 3-hydroxybenzoová (obr. 29, str. 55), kyselina 4-hydroxybenzoová (obr. 30, str. 56) a kyselina 3,4-dihydroxybenzoová (obr. 32, str. 58) nevykazovali s měďnými ionty téměř žádnou měď-chelatační aktivitu.

Měď-chelatační stanovení s indikátorem BCS u vybraných kyselin s měďnatými ionty ukázalo, že žádná z testovaných látek nebyla schopna chelatovat ionty mědi z více jak 30 %. Kyselina 3-hydroxybenzoová (obr. 35, str. 61) vykazovala s měďnatými ionty měď-chelatační aktivitu při pH 7,5 v poměru 10:1 a byla přibližně 15 %. Kyselina 2,4-dihydroxybenzoová (viz obr. 37, str. 63) vykazovala své měď-chelatační schopnosti s měďnatými ionty, a to v poměru 10:1, 70:1 i 100:1, kdy byla chelatační aktivita pouze při vyšších pH (6,8 a 7,5) 30 % a při nižších pH (4,5 a 5,5) nechelatovala vůbec. Kyselina 2-hydroxy-4-methoxybenzoová (viz obr. 39, str. 65) vykazovala nejvýrazněji své měď-chelatační schopnosti s měďnatými ionty, a to v poměru 5:1, kdy byla její

chelatační aktivita při pH 6,8 nad 10 %. V poměru 10:1 při pH 4,5 a 5,5 byla u této kyseliny pouze 7 % chelatace, při pH 7,5 nechelatovala. Kyselina benzoová (obr. 34, str. 60), kyselina 4-hydroxybenzoová (obr. 36, str. 62) a kyselina 3,4-dihydroxybenzoová (obr. 38, str. 64) nevykazovali měď-chelatační aktivitu s měďnatými ionty při žádném námi zkoušeném pH.

Kyselina 3,4-dihydroxybenzoová vykazuje kromě měď-chelatační aktivity (s hematoxylinem) i schopnost chelatovat železnaté ionty tzv. železo-chelatační aktivitu. K chelataci dochází až při vyšším pH 7,5 při poměru 1:1 dochází u této kyseliny k 100% chelataci  $Fe^{2+}$  iontů (Vavřichová et al., 2016).

Z výsledků stanovení měď-chelatační aktivity je možné usoudit, že pro významnější měď-chelatační potenciál je potřeba, aby daná benzoová kyselina měla ve své struktuře dvě hydroxylové skupiny, a to buď v sousední poloze (*ortho* poloze), jak vidíme u kyseliny 3,4-dihydrobenzoové, což je patrné především při použití indikátoru hematoxylinu, nebo v *meta* poloze v případě 2,4-dihydroxybenzoové kyseliny. Z provedeného měření vyplývá, že ani přítomnost methoxy skupiny nesnižuje měď-chelatační aktivitu, ba právě naopak. Je třeba ještě dalších experimentů s dalšími metabolity flavonoidů, abychom mohli konstatovat konkrétnější závěry.

## 9. POUŽITÉ ZKRATKY

zkratka	význam zkratky	český význam
pH	<i>Potential of hydrogen</i>	Potenciál vodíku
Cu	<i>Cuprum</i>	Měď
p-kumaryl-CoA		Para-kumaryl-koenzym A
4-kumarát-CoA ligasa		4-kumarát-koenzym A ligasa
DNA		Deoxyribonukleová kyselina
NADPH		Nikotinamidadenin dinukleotidfosfát
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>	Nízkodenzitní lipoprotein
COX-1	<i>Cyklooxygenase-1</i>	Cyklooxygenasa-1
COX-2	<i>Cyklooxygenase-2</i>	Cyklooxygenasa-2
CTR 1		Transportní protein pro měď 1
ATP7A	<i>Copper-transporting ATPase 1</i>	Přenašeč pro měď spotřebovávající adenosin trifosfát 1
ATP7B	<i>Copper-transporting ATPase 2</i>	Přenašeč pro měď spotřebovávající adenosin trifosfát 2
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>	Adenosin trifosfát
UV	<i>Ultraviolet</i>	Ultrafialové
Manoyl-CoA		Manoyl-koenzym A
HVS-1	<i>Herpes simplex virus 1</i>	Herpes simplex virus 1
HVS-2	<i>Herpes simplex virus 2</i>	Herpes simplex virus 2
CMV		Cytomegalovirus
μM		Mikromolární
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>	Virus lidské imunitní nedostatečnosti
RNA		Ribonukleová kyselina
-OH		Hydroxy skupina
Tzn.		To znamená

<b>Tzv.</b>		Tak zvaně
<b>Apod.</b>		A podobně
<b>Např.</b>		Například
<b>DMSO</b>		Dimethylsulfoxid
<b>BCS</b>		Disodná sůl bathocuproindisulfonové kyseliny
<b>HEM</b>		Hematoxylin
<b>HA</b>		Hydroxylamin hydrochlorid
<b>CUSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O</b>		Pentahydrát síranu měďnatého
<b>Cu<sup>+</sup></b>		Měďné ionty
<b>Cu<sup>+2</sup></b>		Měďnaté ionty
<b>Mw</b>		Molekulová hmotnost
<b>CuCl</b>		Chlorid měďný
<b>HCl</b>		Kyselina chlorovodíková
<b>NaCl</b>		Chlorid sodný
<b>mM</b>		Milimol
<b>H<sub>2</sub>O</b>		Voda
<b>pKa</b>		Disociační konstanta
<b>HCA</b>	<i>Hydroxy Carboxylic Acid receptors</i>	Receptory hydroxykarboxylových kyselin
<b>SULT</b>	<i>Sulfotransferas</i>	Sulfotransferasa
<b>UGT</b>	<i>Glucuronosyltransferase</i>	Glukuronosyltransferasa
<b>COMT</b>	<i>Catechol-O-methyltransferase</i>	Katechol-O-methyltransferasa
<b>LPH</b>	<i>Phlorizin hydrolase</i>	Florizin hydrolasa
<b>HPLC</b>	<i>High-performance liquid chromatography</i>	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

## 10. SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Naměřené hodnoty absorbance v čase 5 minut .....	48
---	----

## 11. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr.1 Systémová a mitochondriální doprava mědi .....	11
Obr. 2 Znázornění transportu mědi v buňce (a) fyziologický stav; (b) patologický stav způsobený poruchou ATP7B při Wilsonově chorobě .....	13
Obr. 3 (A) změna struktury vlasů; (B) pili Torti .....	14
Obr. 4 Flavan – základní struktura flavonoidů .....	16
Obr. 5 Nejdůležitější podskupiny flavonoidů .....	17
Obr. 6 Chemická struktura ovlivňující antioxidantní účinek flavonoidů .....	19
Obr. 7 Chemická struktura kvercetinu .....	24
Obr. 8 (A) obecná struktura flavan-3-ol; (B) (+) - katechin (2R, 3S) častější ze dvou enantiomerů .....	25
Obr. 9 Obecná struktura proanthokyanidinů .....	26
Obr. 10 Kyselina benzoová .....	28
Obr. 11 Kyselina 3-hydroxybenzoová .....	29
Obr. 12 Kyselina 4-hydroxybenzoová .....	30
Obr. 13 Kyselina 3,4-dihydroxybenzoová .....	31
Obr. 14 Kyselina 2,4-dihydroxybenzoová .....	32
Obr. 15 2-hydroxy-4-methoxybenzoová kyselina .....	33
Obr. 16 Schéma mikrotitrační destičky .....	39
Obr. 17 Stanovení chelatace měďnatých iontů hematxylinem .....	42
Obr. 18 Schéma mikrotitrační destičky .....	44
Obr. 19 Schéma mikrotitrační destičky .....	46
Obr. 20 Kalibrační křivka měďnatých iontů v čase 5 minut .....	49
Obr. 21 Schéma mikrotitrační destičky při stanovení chelatace $\text{Cu}^{2+}$ iontů .....	50
Obr. 22 Chelatace $\text{Cu}^{2+}$ iontů hematxylinem při různých hodnotách pH: kyselina benzoová .....	51
Obr. 23 Chelatace $\text{Cu}^{2+}$ iontů hematxylinem při různých hodnotách pH: kyselina 3-hydroxybenzoová .....	51
Obr. 24 Chelatace $\text{Cu}^{2+}$ iontů hematxylinem při různých hodnotách pH: kyselina 4-hydroxybenzoová .....	52
Obr. 25 Chelatace $\text{Cu}^{2+}$ iontů hematxylinem při různých hodnotách pH: kyselina 2,4-dihydroxybenzoová .....	52
Obr. 26 Chelatace $\text{Cu}^{2+}$ iontů hematxylinem při různých hodnotách pH: kyselina 3,4-dihydroxybenzoová .....	53
Obr. 27 Chelatace $\text{Cu}^{2+}$ iontů hematxylinem při různých hodnotách pH: kyselina 2-hydroxy-4-methoxybenzoová .....	53
Obr. 28 Schopnost benzové kyseliny chelatovat $\text{Cu}^+$ ionty v čase 5 minut od přidání indikátoru .....	54
Obr. 29 Schopnost 3-hydroxybenzoové kyseliny chelatovat $\text{Cu}^+$ ionty v čase 5 minut od přidání indikátoru .....	55
Obr. 30 Schopnost 4-hydroxybenzoové kyseliny chelatovat $\text{Cu}^+$ ionty v čase 5 minut od přidání indikátoru .....	56
Obr. 31 Schopnost 2,4-dihydroxybenzoové kyseliny chelatovat $\text{Cu}^+$ ionty v čase 5 minut od přidání indikátoru .....	57

Obr. 32 Schopnost 3,4-dihydroxybenzoové kyseliny chelatovat $\text{Cu}^+$ ionty v čase 5 minut od přidání indikátoru .....	58
Obr. 33 Schopnost 2-hydroxy-4-methoxybenzoové kyseliny chelatovat $\text{Cu}^+$ ionty v čase 5 minut od přidání indikátoru .....	59
Obr. 34 Schopnost benzoové kyseliny chelatovat $\text{Cu}^{2+}$ ionty v čase 5 minut od přidání indikátoru.....	60
Obr. 35 Schopnost 3-hydroxybenzoové kyseliny chelatovat $\text{Cu}^{2+}$ ionty v čase 5 minut od přidání indikátoru .....	61
Obr. 36 Schopnost 4-hydroxybenzoové kyseliny chelatovat $\text{Cu}^{2+}$ ionty v čase 5 minut od přidání indikátoru .....	62
Obr. 37 Schopnost 2,4-dihydroxybenzoové kyseliny chelatovat $\text{Cu}^{2+}$ ionty v čase 5 minut od přidání indikátoru .....	63
Obr. 38 Schopnost 3,4-dihydroxybenzoové kyseliny chelatovat $\text{Cu}^{2+}$ ionty v čase 5 minut od přidání indikátoru .....	64
Obr. 39 Schopnost 2-hydroxy-4-methoxybenzoové kyseliny chelatovat $\text{Cu}^{2+}$ ionty v čase 5 minut od přidání indikátoru.....	65

## 12. POUŽITÁ LITERATURA

- AHERNE A. S., O'BRIEN N.;** Dietary Flavonols: Chemistry, Food Content, and Metabolism, *Nutrition*, 2002, **18**(1), stránky 75-81
- AHMED S. I., HAYAT M. Q., TAHIR M., MANSOOR Q., ISMAIL M., KECK K., BATES R. B.;** Pharmacologically active flavonoids from the anticancer, antioxidant and antimicrobial extracts of *Cassia angustifolia* Vahl, *BMC Complementary And Alternative Medicine*, 2016, **16**(1), stránky 460-470
- AJIBOYE T. O., HABIBU R. S., SAIDU K., HALIRU F. Z., AJIBOYE H. O., ALIYU N. O., IBITOYE O. B., UWAZIE J. N., MURITALA H.F., BELLO S. A., YUSUF I. I., MOHAMMED A. O.;** Involvement of oxidative stress in protocatechuic acid-mediated bacterial lethality, *Microbiologyopen*, 2017, **6**(4)
- AL-MEKHLAFI N. A., SHAARI K., ABAS F., KNEER R., JEYARAJ E. J., STANSLAS J., YAMAMOTO N., HONDA T., LAJIS N. H.;** Alkenylresorcinols and cytotoxic activity of the constituents isolated from *Labisia pumila*, *Phytochemistry*, 2012, **80**, stránky 42-49, ISSN: 0031-9422
- ANDERSEN O.M., MARKHAM K.R.;** *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*, Taylor: Boca Raton, CRC, 2006, ISBN: 0-8493-2021-6
- BAI G., CAO X., ZHANG H., XIANG J., REN H., TAN L., TANG Y.;** Direct screening of G-quadruplex ligands from *Kalopanax septemlobus* (Thunb.) Koidz extract by high performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 2011, **1218**(37), stránky 6433-6438, ISSN: 0021-9673
- BATARIOVÁ A., ČERNÁ M., ŠMÍD J., SPĚVÁČKOVÁ V.;** *Studium koncentrace vybraných toxických a benefitních stopových prvků v lidském organismu*, Univerzita Karlova v Praze, 3. lékařská fakulta, 2007, stránky 8, 39-42, Dizertační práce  
<https://is.cuni.cz/webapps/zzp/detail/13878>
- BECHNÁ K., MLADĚNKA P.;** MĚD A JEJÍ PATO/FYZIOLOGICKÝ VÝZNAM V LIDSKÉM, *Diplomová práce*, Hradec Králové: Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, 2013, strana 4  
<https://is.cuni.cz/webapps/zzp/download/120124861>
- CASSIDY A., MMINIHANE A.-M.;** The role of metabolism (and the microbiome) in defining the clinical efficacy of dietary flavonoids, *American Journal of Clinical Nutrition*, 2017, **105**(1), stránky 10-22, ISSN: 0002-9165
- CIRAK C., RADUSIENE J., JAKSTAS V., IVANAUSKAS L., SEYIS F., YAYLA F.;** Secondary metabolites of seven *Hypericum* species growing in Turkey, *Pharmaceutical Biology*, 2016, **54**(10), stránky 2244-2253
- CLARK J. K., ZAHRADKA P., TAYLOR C. G.;** Efficacy of flavonoids in the management of high blood pressure, *Nutrition Reviews*, 2018, **73**(12), stránky 799-822, ISSN: 00296643

**CRAMPTON L.**; "Health Effects of Benzoic Acid, Sodium Benzoate and Benzene", 2014, Available: <https://caloriebee.com/nutrition/Effects-of-Benzoic-Acid-and-Benzoates-in-Food-and-Medicines> [Online] [Accessed: 12-July-2017]

**ČR, M. zdravotnictví;** *Český lékopis*, Praha: Grada Publishing, a.s., 2009; benzoe sumatranus, strana 1455 (2.díl Českého lékopisu); benzoe tonkinensis, strana 11525 (doplňěk 2016)

**DAS S., BISHT S. S.;** The bioactive and therapeutic potential of Hemidesmus indicus R. Br. (Indian Sarsaparilla) root, *Phytotherapy Research: PTR*, 2013, **27**(6), stránky 791-801, ISSN: 0951-418X

**DU J., SINGH H., YI T.-H.;** Antibacterial, anti-biofilm and anticancer potentials of green synthesized silver nanoparticles using benzoin gum (Styrax benzoin) extract, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2016, **39**(12), stránky 1923-1931, ISSN: 16157605, 16157591

**ERUKAINURE O. L., HAFIZUR R. M., CHOUDHARY M. I., ADHIKARI A., MESAİK A. M., ATOLANI O., BANERJEE P., PREISSNER R., MUHAMMAD A., ISLAM Md. S.;** Anti-diabetic effect of the ethyl acetate fraction of Clerodendrum volubile: protocatechuic acid suppresses phagocytic oxidative burst and modulates inflammatory cytokines, *In Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017, **86**, stránky 307-315, ISSN: 0753-3322

**FERRARS R. M., CZANK CH., SAHA S., NEEDS P. W., ZHANG Q., RAHEEM K. S., BOTTING N. P., KROON P. A., KAY C. D.;** Methods for Isolating, Identifying, and Quantifying Anthocyanin Metabolites in Clinical Samples, *Analytical chemistry*, 2014, **86**(20), stránky 1052-1058

**GAO K., XU A., KRUL C., VENEMA K., LIU Y., NIU Y., LU J., BENSOUSSAN L., SEERAM N. P., HEBER D., HENNING S. M.;** Of the Major Phenolic Acids Formed during Human Microbial Fermentation of Tea, Citrus, and Soy Flavonoid Supplements, Only 3,4-Dihydroxyphenylacetic Acid Has Antiproliferative Activity, *The Journal of Nutrition*, 2006, **136**(1), stránky 52-57

**GHERIDA K.;** Flavonoids: Structure, biological activities, prophylactic function and therapeutic uses, *Phytotherapi*, 2005, **3**(4), stránky 162-169, ISSN: 16248597

**HIROSHI A., CLIFFORD M. N., CROZIER A.;** *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*, Oxford: Blackwell Publishing, 2006, stránky 2-9; 17-19, ISBN-13: 978-1-4051-2509-3; ISBN-10: 1-4051-2509-8

**HOLLMAN P. C. H.;** Absorption, Bioavailability, and Metabolism of Flavonoids, *Pharmaceutical Biology*, 2004, **42**, stránky 74-83, ISSN: 1388-0209

**HORDYJEWSKA A., POPIOLEK L., KOCOT J.;** The many "faces" of copper in medicine and treatment, *Biometals: An International Journal On The Role Of Metal Ions In Biology, Biochemistry, And Medicine*, 2014, **27**(4), stránky 611-621, ISSN: 09660844

**HUNG Y-CH., WANG P-W., PAN T-L., BAZYLAK G., LEU Y-L.;** Proteomic screening of antioxidant effects exhibited by Radix Salvia miltiorrhiza aqueous extract in cultured rat aortic smooth muscle cells under homocysteine treatment, *Journal of Ethnopharmacology*, 2009, **124**(3), ISSN: 0378-8741

**CHADWICK L. R., PAULI G. F., FARNSWORTH N. R.;** The pharmacognosy of *Humulus lupulus* L. (hops) with an emphasis on estrogenic properties; *Phytomedicine*; 2006; **13**(1), stránky 119-131, ISSN: 0944-7113

**CHOUDHARY I. M., AZIZUDDIN, JALIL S., NAWAZ S. A., KHAN K. M., TAREEN R. B., RAHMAN;** Antiinflammatory and lipoxygenase inhibitory compounds from *Vitex agnus-castus*, 2009, **23**(9), stránky 1336-1339, ISSN: 0951418X, 10991573

**JAROŠOVÁ I., KOCOURKOVÁ B.;** *Obsah silic v mířkovitých druzích koření napadených houbovými chorobami*, Agronomická fakulta, Brno: Mendelova Univerzita v Brně, 2010, stránky 11-14, Diplomová práce

[http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:zCdHCrnW1coJ:is.mendelu.cz/zp/porta](http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:zCdHCrnW1coJ:is.mendelu.cz/zp/portal_zp.pl%3Fprehled%3Dvyhledavani%3Bpodrobnosti%3D35850%3Bdownload_prace%3D1+&cd=24&hl=cs&ct=clnk&gl=cz)  
[l](http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:zCdHCrnW1coJ:is.mendelu.cz/zp/porta)  
[rtal\\_zp.pl%3Fprehled%3Dvyhledavani%3Bpodrobnosti%3D35850%3Bdownload\\_prace%3D1+&](http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:zCdHCrnW1coJ:is.mendelu.cz/zp/porta)  
[cd=24&hl=cs&ct=clnk&gl=cz">cd=24&hl=cs&ct=clnk&gl=cz](http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:zCdHCrnW1coJ:is.mendelu.cz/zp/porta)

**JUURLINK B. H. J., AZOUZ H. J., ALDALATI A. M. Z., AITINAWI B. H. M., GANGULY P.;** Hydroxybenzoic acid isomers and the cardiovascular system, *NUTRITION JOURNAL*, 2014, **13**(1), strana 63, ISSN: 1475-2891

**KARABIN M., HUDCOVÁ T., JELÍNEK L., DOSTÁLEK P.;** Research review paper: Biotransformations and biological activities of hop flavonoids, *Department of Biotechnology, Faculty of Food and Biochemical Technology, University of Chemistry and Technology, Prague*, 2014, **33**(6), stránky 1063-1090, ISSN: 0734-9750

**KHAN S. A., CHATTERJEE S. S., KUMAR V.;** Low dose aspirin like analgesic and anti-inflammatory activities of mono-hydroxybenzoic acids in stressed rodents, *In Life Sciences*, 2016, **148**, stránky 53-62, ISSN: 0024-3205

**KUMAR S., PANDEY A. K.;** Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview, *Scientific World Journal*, 2013, ISSN: 1537-744X

**LAGO J. H., TOLEDO-ARRUDA A. C., MERNAK M., BAROSSA K. H., MARTINS M. A., TIBÉRIO I. F., PRADO C. M.;** Structure-activity association of flavonoids in lung diseases, *Molecules*, 2014, **19**(3), stránky 3570-3595

**LEE K. T., ROH H. S., YU J. S., BAEK J., LEE S., RA M., KIM S. Y., BAEK K. H., KIM K. H.;** Pinecone of *Pinus koraiensis* Inducing Apoptosis in Human Lung Cancer Cells by Activating Caspase-3 and its Chemical Constituents, *Chemistry & biodiversity*, 2017, **14**(4), ISSN: 16121880, 16121872

**LEWIS J. R.;** *Hawley's condensed chemical dictionary*, 14. vydání, New York, NY: John Wiley & Sons, Inc., 2001, strana 125, ISBN: 978-0471387350

**MA CH-H, CHEN B., QI H-Y, LI B-G, ZHANG G-L.;** Two Pyranocoumarins from the Seeds of *Calophyllum polyanthum*, *Journal of natural products*, 2004, **67**(9), stránky 1598-1600, ISSN: 0163-3864

**MAREČEK Z., BRŮHA R.;** Wilsonova choroba, *Vnitřní lékařství*, 2013, **59**(7), stránky 578-583, ISSN: 0042773X, 18017592

**MAZOL I., GLENSK M., CISOWSKI W.;** Polyphenolic compounds from *Platycodon grandiflorum* A. DC. *Acta poloniae pharmaceutica*, 2004, **61**(3), stránky 203-208  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15481246>

**MICHALICOVÁ A., KARLÍČKOVÁ J.;** *Stanovenie chelatácie medi u flavónov bathocuproinovou metódou*, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, 2014, Rigorózní práce

**NAVRÁTILOVÁ Z.;** Vitex agnus-castus – obsahové látky a léčivé účinky, *Praktické lékárenství*, 2015, **11**(4), stránky 138-139, <https://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2015/04/05.pdf>

**PACHECO-PALENCIA L. A., DUNCAN CH. E., TALCOTT S. T.;** Phytochemical composition and thermal stability of two commercial açai species, *Euterpe oleracea* and *Euterpe precatoria*, *Food Chemistry*, 2009, **115**(4), stránky 1199-1205, ISSN: 0308-8146

**PARMAR V. S., JHA A., BISHT K. S., TANEJA P., SINGH S. K., KUMAR A., POONAM, JAIN R., OLSEN C. E.;** Constituents of the yew trees, *Phytochemistry*, 1999, **50**(8), stránky 1267-1304, ISSN: 00319422

**PÁSKOVÁ R.;** Ovocné kyseliny a jejich účinky na pleť, [www.dermatologiepropraxi.cz](http://www.dermatologiepropraxi.cz), 2014, **8**(4), stránky 157-160, <https://solen.cz/pdfs/der/2014/04/09.pdf>

**RAWAT S., JUGRAN A. K., BHATT I. D., RAWAL R. S., NANDI S. K.;** Effects of genetic diversity and population structure on phenolic compounds accumulation in *Hedychium spicatum*, *Ecological Genetics and Genomics*, 2017, **3-5**, stránky 25-33, ISSN: 2405-9854

**RICE-EVANTS C. A., PACKER L.;** *Flavonoids in Health and Disease*, New York, Marcel Dekker, 2003, stránky 376-382, ISBN: 0-8247-4234-6

**RINES A. K., ARDEHALI H.;** Transition metals and mitochondrial metabolism in the heart, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2013, **55**, stránky 50-57, ISSN: 0022-2828

**RIO D. D., RODRIGUEZ-MATEOS A., SPENCER J. P. E., TOGNOLINI M., GORGES G., CROZIER A.;** Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases, *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING*, 2013, **18**(14), stránky 1818-1892

**ŘÍHA M., KARLÍČKOVÁ J., FILIPSKÝ T., MACÁKOVÁ K., HRDINA R., MLADĚNKA P.;** Novel method for rapid copper chelation assessment confirmed low affinity of D-penicillamine for copper in comparison with trientine and 8-hydroxyquinolines, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2013, **123**, stránky 80-87, ISSN: 0162-0134

**ŘÍHA M., KARLÍČKOVÁ J., FILIPSKÝ T., MACÁKOVÁ K., ROCHA L., BOVICELLI P., SILVESTRI I. P., SASO L., JAHODÁŘ L., HRDINA R., MLADĚNKA P.;** In vitro evaluation of copper-chelating properties of flavonoids, *The Royal Society of Chemistry*, 2014, **4**(62), stránky 32628-32638, ISSN: 000341083400005

**ŘÍHOVÁ A., KVASNIČKOVÁ E.;** *FLAVONOIDY, Stručný přehled a biologický význam*, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, katedra biochemie, 2008, stránky 10-15, Bakalářská práce

**SAHA A., MUKHERJEE S., SETH J., BASU S.;** Menke's kinky hair disease with visual pathway defect: An association or coincidence?, *Indian Journal of Paediatric Dermatology*, 2015, **16**(2), stránky 81-83

**SEERAM N. P., BOURQUIN L. D., NAIR M. G.;** Degradation Products of Cyanidin Glycosides from Tart Cherries, *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 2001, **49**(10), stránky 4924-4929, ISSN: 000171615100064

**SINGH B., KUMAR A., MALIK A. K.;** Flavonoids biosynthesis in plants and its further analysis by capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, 2017, ISSN: 15222683, 01730835

**SIRCAR D., DEY G., MITRA A.;** A validated HPLC method for simultaneous determination of 2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde and 2-hydroxy-4-methoxybenzoic acid in root organs of *Hemidesmus indicus*, *CHROMATOGRAPHIA*, 2007, **56**(5-6), stránky 349-353, ISSN: 00095893

**SMPOKOU P., SAMANTA M., BERRY G. T., HECHT L., ENGLE E. C., LICHTER-KONECKI U.;** Menkes disease in affected females: the clinical disease spectrum, *American Journal Of Medical Genetics*, 2015, **167** A(2), stránky 417-420

**SQUITTI R., SIOTTO M., POLIMANTI R.;** Low-copper diet as a preventive strategy for Alzheimer's disease, *Neurobiology of aging*, 2014, **35**(2), stránky 40-50, ISSN: 01974580

**TROJAN S., a kolektiv.;** *Lékařská fyziologie, 4. přepracované a doplněné vydání*, Praha: Grada Publishing, a.s., 2003, ISBN: 80-247-0512-5

**VAVŘICHOVÁ N., MACÁKOVÁ K.;** *Železo-chelatační účinky metabolitů flavonoidů - malých polyfenolických látek*, Hradec Králové: Univerzita Karlova, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, 2016, Diplomová práce

**VIDAK M., ROZMAN D., KOMEL R.;** Effects of Flavonoids from Food and Dietary Supplements on Glial and Glioblastoma Multiforme Cells, *Molecules*, 2015, **20**(10), stránky 19406-19432, ISSN: 1420-3049

**WEI Z., JUNWEI L., JUNLI Y., GUOHUAI L.;** Effects of phytotoxic extracts from peach root bark and benzoic acid on peach seedlings growth, photosynthesis, antioxidance and ultrastructure properties, *Scientia Horticulturae*, 2017, **215**, stránky 49-58, ISSN: 0304-4238

**Wikipedia, the free encyclopedia. [online], 4-hydroxybenzoic acid, [online], [https://en.wikipedia.org/wiki/4-Hydroxybenzoic\\_acid](https://en.wikipedia.org/wiki/4-Hydroxybenzoic_acid) [Accessed: 01-May-2017]**

**YADAV A. K., BORAH D., GOGOI D., POOJA A. P.;** Flavonoids - World Healthiest Gift for the Benefit of Human Health, *Journal of Commercial Biotechnology*, 2015, **21**(4), stránky 8-9, ISSN: 1478565X, 14628732

**YETT JAY R.;** Copper, *Salem Press Encyclopedia of Science*, 2013, strana 7, ISSN: 89474623

**ZHANG H., TSAO R.;** Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects, *Current Opinion in Food Science*, 2016, **8**, stránky 33-42, ISSN: 2214-7993

**ZHONG C., HU D., HOU L. B., SONG L. Y., ZHANG Y. J., XIE Y., TIAN L. W.;** Phenolic Compounds from the Rhizomes of *Smilax china* L. and Their Anti-Inflammatory Activity, *Molecules*, 2017, **22**(4), strana 515, ISSN: 1420-3049