

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



**VLIV METABOLITŮ FLAVONOIDŮ (FENYLOCTOVÝCH KYSELIN)
NA ŽELEZEM KATALYZOVANOU FENTONOVU REAKCI**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Předkládá: Kristýna Podlesná

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Zuzana Lomozová, Ph.D.

Hradec Králové, 2025

CHARLES UNIVERSITY
FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRÁLOVÉ
DEPARTMENT OF PHARMACOGNOSY AND PHARMACEUTICAL BOTANY



**THE IMPACT OF METABOLITES OF FLAVONOIDS
(PHENYLACETIC ACIDS) ON THE IRON-CATALYSED FENTON REACTION**

DIPLOMA THESIS

Submitted by: Kristýna Podlesná

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

Hradec Králové, 2025

PROHLÁŠENÍ

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

V Hradci Králové, 2025

Kristýna Podlesná

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych touto cestou poděkovala své vedoucí diplomové práce PharmDr. Zuzaně Lomozové, Ph.D. za pečlivý odborný dohled, přínosné rady, věcnou zpětnou vazbu a ochotu během konzultací. Velmi si vážím veškerého času a pomoci, kterou mi poskytla při vypracování mé diplomové práce.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakognosie a farmaceutické botaniky

Kandidát: Kristýna Podlesná

Školitel: PharmDr. Zuzana Lomozová, Ph.D.

Název diplomové práce: Vliv metabolitů flavonoidů (fenyloctových kyselin) na železem katalyzovanou Fentonovu reakci

Klíčová slova: železo, flavonoidy, fenyloctové kyseliny, Fentonova reakce, antioxidant, pro-oxidant

Železo je biogenní stopový prvek, který hraje nezastupitelnou roli v lidském organismu. Vzhledem ke schopnosti přecházet mezi oxidačními stavy Fe^{2+} a Fe^{3+} působí jako biokatalyzátor chemických reakcí. Množství železa v těle je přísně regulováno, protože jeho nedostatek i nadbytek mohou vyústit v širokou škálu patologických stavů, včetně anémie nebo oxidativního poškození tkání.

Flavonoidy tvoří rozsáhlou skupinu sekundárních metabolitů rostlin. Jsou běžnou součástí lidské stravy a jejich konzumace je spojena s mnoha zdravými prospěšnými účinky. Vykazují především antioxidační aktivitu. Za určitých okolností však mohou působit i opačným efektem jako pro-oxidanty. Flavonoidy před vstupem do systémové cirkulace podléhají rozsáhlému metabolismu. Jsou transformovány na malé fenolické látky, mezi které patří i fenyloctové kyseliny.

V této diplomové práci byl pomocí HPLC metody hodnocen vliv osmi fenyloctových kyselin na snížení nebo zvýšení produkce hydroxylových radikálů během železem indukované Fentonovy reakce v rámci dvou pato/fyziologických podmínek pH 4,5 a 7,5. Zatímco u kyseliny fenyloctové, 2-hydroxyfenyloctové, 3-hydroxyfenyloctové a homovanilové byly zaznamenány antioxidační vlastnosti, kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová a 3-hydroxy-4-methoxyfenyloctová projevily vlastnosti pro-oxidační.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany

Candidate: Kristýna Podlesná

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

Title of Thesis: The impact of metabolites of flavonoids (phenylacetic acids) on the iron-catalysed Fenton reaction

Keywords: iron, flavonoids, phenylacetic acids, Fenton reaction, antioxidant, pro-oxidant

Iron is a biogenic trace element that plays an irreplaceable role in the human body. Due to its ability to switch between the oxidation states of Fe^{2+} and Fe^{3+} , it acts as a biocatalyst in chemical reactions. The amount of iron in the body is tightly regulated, as both deficiency and excess can result in a wide range of pathological conditions, including anemia or oxidative tissue damage.

Flavonoids form a large group of secondary metabolites in plants. They are a common part of the human diet, and their consumption is associated with many health benefits. In particular, they exhibit antioxidant activity. However, under certain circumstances, they can also exert the opposite effect as pro-oxidants. Flavonoids are extensively metabolised before entering the systemic circulation. They are transformed into small phenolic substances, including phenylacetic acids.

In this thesis, the effect of eight phenylacetic acids on the decrease and increase of hydroxyl radical production during the iron-induced Fenton reaction under two patho/physiological conditions of pH 4,5 and 7,5 was evaluated by HPLC. While phenylacetic acid, 2-hydroxyphenylacetic acid, 3-hydroxyphenylacetic acid, and homovanillic acid showed antioxidant properties, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and 3-hydroxy-4-methoxyphenylacetic acid showed pro-oxidant properties.

OBSAH

1	ÚVOD	10
2	CÍL PRÁCE	12
3	TEORETICKÁ ČÁST	13
3.1	Železo.....	13
3.1.1	Železo jako chemický prvek	13
3.1.2	Železo v lidském organismu	13
3.1.2.1	Homeostáza železa.....	14
3.1.2.2	Příjem a absorpce železa	15
3.1.2.3	Transport a ukládání železa	16
3.1.3	Patologické stavy spojené se železem	17
3.1.3.1	Nedostatek železa a s ním související onemocnění	17
3.1.3.2	Nadbytek železa a s ním související onemocnění.....	18
3.2	Oxidační stres	21
3.3	Fentonova reakce	23
3.4	Antioxidanty	23
3.5	Flavonoidy	24
3.5.1	Chemická struktura a klasifikace flavonoidů.....	25
3.5.2	Syntéza flavonoidů	30
3.5.3	Absorpce flavonoidů.....	31
3.5.4	Metabolismus flavonoidů	33
3.5.5	Antioxidační a pro-oxidační účinky flavonoidů	34
3.6	Testované látky	37
3.6.1	Fenylactová kyselina.....	37
3.6.2	2-hydroxyfenylactová kyselina	38
3.6.3	3-hydroxyfenylactová kyselina	38

3.6.4	4-hydroxyfenyloctová kyselina	39
3.6.5	2,4-dihydroxyfenyloctová kyselina	40
3.6.6	3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina	40
3.6.7	3-hydroxy-4-methoxyfenyloctová kyselina	41
3.6.8	4-hydroxy-3-methoxyfenyloctová kyselina/homovanilová kyselina	41
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	43
4.1	Chemikálie	43
4.2	Materiál	44
4.3	Přístrojové vybavení	44
4.4	Využívané programy	44
4.5	Příprava zásobních roztoků a roztoků využívaných během experimentu	45
4.6	Příprava mobilní fáze	46
4.7	Průběh experimentu	46
4.8	Matematické a statistické vyhodnocení	47
5	VÝSLEDKY	49
5.1	Vliv testovaných fenylactových kyselin na železem katalyzovanou Fentonovu reakci	50
5.1.1	Vliv kyseliny fenylactové	50
5.1.2	Vliv kyseliny 2-hydroxyfenylactové	51
5.1.3	Vliv kyseliny 3-hydroxyfenylactové	51
5.1.4	Vliv kyseliny 4-hydroxyfenylactové	52
5.1.5	Vliv kyseliny 2,4-dihydroxyfenylactové	53
5.1.6	Vliv kyseliny 3,4-dihydroxyfenylactové	53
5.1.7	Vliv kyseliny 3-hydroxy-4-methoxyfenylactové	54
5.1.8	Vliv kyseliny 4-hydroxy-3-methoxyfenylactové/kyseliny homovanilové	55
6	DISKUSE	56
7	ZÁVĚR	60

8	SEZNAM ZKRATEK	61
9	SEZNAM TABULEK	62
10	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	62
11	POUŽITÁ LITERATURA.....	64

1 ÚVOD

Železo je biogenním stopovým prvkem lidského organismu. Vzhledem ke své schopnosti vyskytovat se v oxidačních stavech +II a +III, mezi kterými může snadno přecházet, zabezpečuje řadu biologických funkcí a tvoří aktivní komponentu mnoha proteinů, kde plní nezastupitelnou funkční nebo strukturální roli. Pro správné fungování organismu je důležitá jeho homeostáza. Její narušení ve smyslu nadbytku nebo nedostatku může být příčinou mnoha patologických stavů.

Nadbytek železa a jeho redoxní schopnosti přispívají k produkci reaktivních forem kyslíku, hydroxylových radikálů, a to prostřednictvím Fentonovy reakce, během které železo vystupuje jako biokatalyzátor. Vznik hydroxylových radikálů může vést k rozvoji oxidačního stresu, který úzce souvisí s oxidativním poškozením biomolekul a orgánů, se zánětlivými procesy, s patogenetickými mechanismy různých onemocnění a procesy stárnutí.

Flavonoidy jsou skupinou polyfenolických sekundárních metabolitů rostlin. Zastupují důležitou roli v interakci rostlinné buňky s vnějším prostředím. Do lidského těla jsou přijímány prostřednictvím potravin a nápojů rostlinného původu a svými účinky pozitivně ovlivňují zdraví. Vykazují především antioxidační aktivitu, která je spojena se schopností neutralizovat a potlačovat tvorbu reaktivních forem kyslíku, chelátovat ionty přechodných kovů, železa a mědi, a regulovat antioxidační obranu organismu. Kromě toho však mohou za určitých okolností působit i pro-oxidačně a iniciovat oxidativní poškození organismu.

Před vstupem do systémového oběhu jsou flavonoidy extenzivně metabolizovány v tenkém a tlustém střevě, a to na flavonoidní aglykony a dále na katabolické produkty, mezi které lze řadit i fenylactové kyseliny, jejichž potenciální antioxidační a pro-oxidační vlastnosti jsou předmětem zkoumání této diplomové práce.

Práce je členěna na teoretickou a experimentální část. Teoretická část se zaměřuje na charakteristiku železa, jeho homeostázu v lidském organismu a na patologické stavy spojené s jejím narušením, včetně rozvoje oxidačního stresu prostřednictvím Fentonovy reakce. Dále se věnuje charakteristice flavonoidů a jejich kolonických metabolitů – osmi fenylactovým kyselinám – a jejich biologickým účinkům. Na teoretickou část navazuje část experimentální, která se zabývá hodnocením

antioxidačních a prooxidačních vlastností těchto kyselin, přesněji jejich schopnostmi snižovat či zvyšovat produkci hydroxylových radikálů během železem indukované Fentonovy reakce.

2 CÍL PRÁCE

Cílem předkládané diplomové práce bylo stanovit antioxidační a pro-oxidační účinky vybraných flavonoidních metabolitů, přesněji fenylactových kyselin, jakožto katabolických produktů vznikajících činností mikrobioty tlustého střeva, a posléze zhodnotit vztah mezi strukturou a zjištěným biologickým účinkem. K dosažení cílů práce byla využita *in vitro* HPLC metoda měření inhibice nebo indukce produkce volných radikálů při železem indukované Fentonově reakci v rámci pato/fyziologických podmínek pH 4,5 a 7,5.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Železo

3.1.1 Železo jako chemický prvek

Železo, chemického symbolu Fe vycházejícího z latinského *ferrum* (= pevný), je přechodným kovem 8. skupiny periodického systému prvků s atomovým číslem 26 a elektronovou konfigurací [Ar] 3d⁶4s² [1, 2].

Jedná se o pevný, kujný, tažný stříbrošedý kov se schopností vést elektrický proud a teplo, zároveň o druhý nejrozšířenější kov na Zemi [2]. V přírodě tvoří hlavní podíl zemské kůry a jádra. Ve své čisté podobě se však nachází zřídka, mnohem častější je zastoupení železné rudy jakožto hmoty železa a dalších minerálů a prvků, typicky hematitu, magnetitu, limonitu, sideritu a dalších [1, 2]. Nejčastěji se vyskytuje v oxidačních stavech +II a +III, mezi kterými může snadno přecházet a tvořit dvojmocné a trojmocné sloučeniny [2].

3.1.2 Železo v lidském organismu

Železo patří mezi stopové prvky našeho organismu, které mají zásadní biologickou roli. Stejně jako v přírodě se i v lidském těle vyskytuje nejčastěji ve dvou oxidačních stavech, a to jako iont železnatý oxidačního čísla +II a iont železitý oxidačního čísla +III. Tato schopnost vystupovat ve dvou stabilních oxidačních stavech činí z železa významný biokatalyzátor chemických reakcí [3]. Jako součást hemoglobinu, proteinu vázajícího železo v červených krvinkách, zprostředkovává přenos kyslíku po těle [4, 5]. Uvolňovaný kyslík tkáně poté využívají k oxidačnímu metabolismu [4]. Železo tvoří rovněž složku myoglobinu, kde napomáhá zajišťovat přenos a využití kyslíku ve svalové tkáni [4, 5]. Dále je aktivní komponentou bílkovin elektrontransportního řetězce, Fe/S bílkovin s prostetickou skupinou tvořenou železem a sírou a cytochromů. [3, 5]. Uplatňuje se v procesech oxidativní fosforylace, syntézy DNA nebo katalýzy biologických oxidací [3].

Fyziologické množství železa v organismu se pohybuje mezi 3 až 5 gramy, přičemž značná část, zhruba 60 %, je začleněna do hemoglobinu a asi 10 % tvoří součást myoglobinu. Zbytek se nachází v hepatocytech a retikuloendotelových makrofázích,

přesněji ve formě snadno mobilizovatelných zásob železa [6]. Zásobní funkci v hepatocytech a retikuloendotelových makrofázích zprostředkovává feritin a hemosiderin [5].

3.1.2.1 Homeostáza železa

I přes svou nezastupitelnou úlohu může být železo pro organismus toxické, pokud je přítomno v nadbytku. Proto lidské tělo vyvinulo mechanismy udržující jeho hladinu v optimálním rozmezí – systém homeostázy železa, jejíž schéma zobrazuje „*Obrázek 1*“ [7]. Homeostáza železa představuje vysoce vyvážený a pečlivě regulovaný systém zohledňující vstřebávání, využití a ztráty železa v organismu [8].

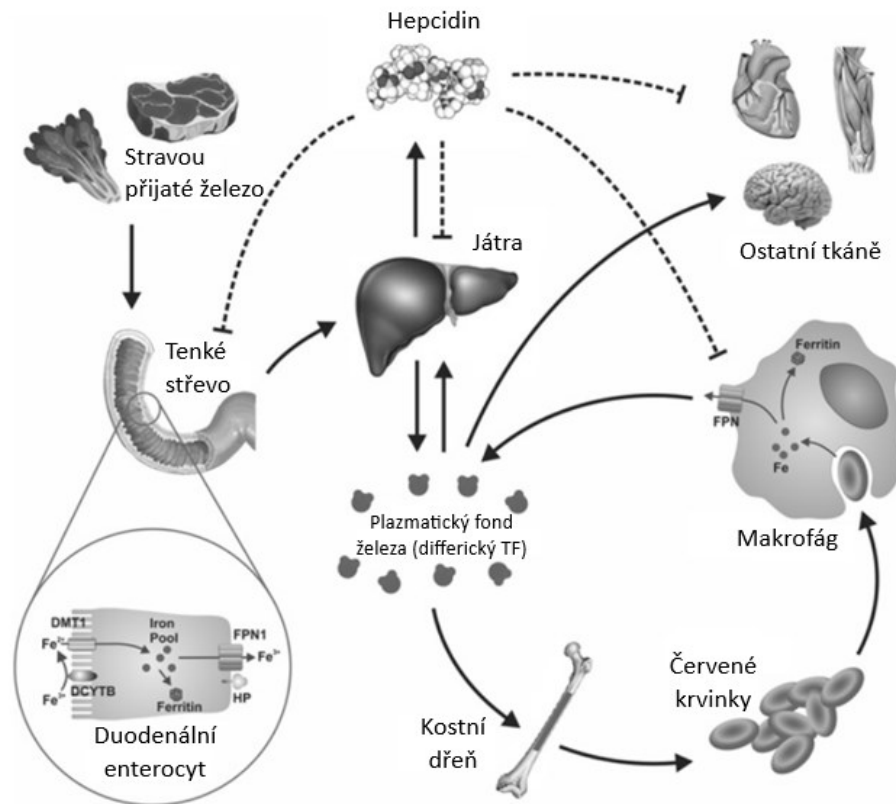
Vzhledem k absenci řízeného exkrečního mechanismu se železo vylučuje pouze skrze pot, krevní ztráty, odumřelé intestinální buňky a deskvamaci pokožky. Denně se tímto způsobem vyloučí 1 až 2 miligramy. Tyto ztráty by měly být kompenzovány příjmem potravy s přibližně stejným množstvím železa. I přes značně vyšší denní potřeby organismu je toto množství dostatečné, a to vzhledem k přesné regulaci a recyklaci železa [6].

Systémově je železo regulováno řadou faktorů, mezi které řadíme tělesné zásoby železa v organismu, změny rychlosti erythropoézy, ale i hypoxii. To znamená, že například při stavu nízkých tělesných zásob železa nebo zvýšené rychlosti erythropoézy dochází ke zvýšení jeho vstřebávání a množství uvolňovaného železa retikuloendotelovým systémem [8].

Na řízení systémové homeostázy se značnou měrou podílí peptidový hormon hepcidin cirkulující v lidském těle. Jedná se o 25 aminokyselinový peptid produkovaný játry, který vazbou na ferroportin podporuje jeho degradaci a zároveň jím zamezuje přestup železa do systémové cirkulace. Výsledkem je omezení vstupu železa do plazmy a jeho zadržování ve tkáních. Expresi hepcidinu vyvolává vyšší hladina samotného železa nebo zánětlivé stimuly organismu. Potlačuje ji naopak nedostatek železa či zvýšená potřeba erythropoézy [8,9].

Recyklaci železa zabezpečuje již zmíněný retikuloendotelový systém. Nejprve buňky tohoto systému pohlcují erythrocyty nacházející se na konci jejich životního cyklu [3]. Následně dochází k degradaci erythrocytů přítomnými hydrolytickými enzymy. Hem, který se uvolňuje z hemoglobinu, je hemoxygenázou katabolizován na biliverdin,

oxid uhelnatý a železnaté ionty. Takto recyklované železo se uskladňuje, nebo uvolňuje k dalšímu využití [10].



Obrázek 1: Homeostáza železa - převzato a upraveno [7].

3.1.2.2 Příjem a absorpce železa

Veškeré železo je do organismu přijímáno skrze stravu. V potravě se nachází jeho dvě možné formy, a to železo nehemové a hemové. Nehemové železo je zastoupené v široké škále potravin, jak živočišného, tak zejména rostlinného původu. V nich se vyskytuje v různých formách — například v nízkomolekulárních komplexech, ve ferritinu nebo katalytických centrech řady proteinů. Značná část tohoto železa není pevně vázána v protoporfyrinovém kruhu, a tím je vystaveno mnoha faktorům ovlivňující jeho vstřebatelnost. K těmto faktorům patří pH žaludku a proximálního tenkého střeva, přítomnost některých organických kyselin nebo některých složek potravy jako fytátů, tříslovin a polyfenolů. Zatímco nižší pH proximální části gastrointestinálního traktu a přítomnost kyseliny citronové či askorbové činí nehemové

železo dostupnější, fytáty, třísloviny a polyfenoly vstřebávání brání tvorbou nerozpustných komplexů [7, 11].

Naproti tomu hemové železo, přijímané výhradně živočišnou stravou jako součást hemoglobinu nebo myoglobinu, je pevně vázáno v protoporphyrinovém kruhu. Vlivem toho není zpřístupněno faktorům působících na biologickou dostupnost a vstřebává se tak velmi dobře [7, 11].

K absorpci železa dochází převážně v tenkém střevě a spočívá ve vychytávání a přenosu železa přes enterocyty do systémové cirkulace. Přenašečové proteiny podílející se na absorpci se nalézají na apikálním a bazolaterálním povrchu enterocytu. Apikální část je ve spojení se střevním lumen a bazolaterální se systémovým oběhem [4].

Nehemové železo se ve své železité formě nejprve redukuje na železnaté. Klíčovou roli v tomto procesu sehraje prostředí kyseliny chlorovodíkové, které rozpouští nehemové železo a činí ho k redukci přístupnějším. Samotná redukce probíhá účinkem ferrireduktáz – duodenální cytochrom B reduktázou 1 (DCYTB) či jinými reduktázami nebo neenzymatickými redukčními činidly, například kyselinou askorbovou, která zároveň brání vysrážení železa jeho chelatací. Po konverzi železo přechází jako substrát transportéru dvoumocných iontů 1 (DMT1) apikální membrány do enterocytu. Podle potřeby organismu následně dochází buď k přestupu přes bazolaterální membránu enterocytu ferroportinem do krevního oběhu, nebo k jeho uložení v zásobní bílkovině feritinu. Bazolaterální přestup usnadňuje ferroxidáza ceruloplazmin či jeho membránový homolog hephaestin, která ve spojení s ferroportinem železnaté ionty oxiduje zpět na železitou formu [4, 9].

Absorpce hemového železa dosud nebyla plně objasněna. Probíhá pravděpodobně endocytózou v nezměněné podobě na okraji enterocytu. V enterocytu se železo z hemu uvolňuje účinkem hemoxygenázy a je využíváno obdobně jako železo nehemové [9].

3.1.2.3 Transport a ukládání železa

Vazbu a transport železa krevním řečištěm k cílovým buňkám zprostředkovává transferin ihned po přestupu železa bazolaterální membránou. Tato transportní bílkovina váže s vysokou afinitou jeden až dva atomy trojmocného železa za vzniku

komplexu Tf-Fe³⁺, který interaguje s transferinovými receptory exprimovanými na většině tělních buněk a přestupuje do jejich endozomů. Uvolnění železa z komplexu vyvolává okyselení endozomálních vezikul, po kterém nastává redukce zprostředkovaná ferrireduktázami a přestup železa do cytosolu přes DMT1, kde je využíváno k fyziologickým procesům [5, 9]. Nejpodstatnější část vstřebaného železa je distribuována k erytroblastům k syntéze hemu a hepatocytům, a to za účelem uskladnění ve formě feritinu [12]. Železem je v organismu fyziologicky nasycena zhruba 1/3 transferinu. Zbylá část transferinu funguje jako pufr bránící hromadění toxického železa, které na transferin vázáno není [9].

Nadbytečné množství železa se ukládá do snadno mobilizovatelných zásob ve formě solubilního, již zmiňovaného feritinu a hemosiderinu. Feritin, zásobní bílkovina s feroxidázovou aktivitou, se skládá ze 24 podjednotek. Ukládá přebytečné intracelulární železo do ferihydritového minerálního jádra. Takto sekvestrované železo je buď mobilizováno z buněk nebo vylučováno odlupováním enterocytů na konci jejich životního cyklu [6]. Druhou zásobní formou železa tvoří hemosiderin, který je formován oxidy železa a dalšími komponenty, a při zvýšené poptávce organismu železo poskytuje obdobně jako feritin [5].

3.1.3 Patologické stavy spojené se železem

Narušení homeostázy železa může vést k jeho nedostatku či nadbytku v lidském organismu, přičemž důsledkem tohoto narušení může být následný rozvoj celé řady závažných zdravotních problémů [13].

3.1.3.1 Nedostatek železa a s ním související onemocnění

Za nedostatek železa se označuje stav, kdy jeho systémové hladiny nejsou dostatečné pro správný průběh fyziologických procesů [13]. Nedostatek železa vzniká vlivem jeho zvýšené potřeby, sníženého příjmu potravou, nedostatečného vstřebávání nebo chronické ztráty krve. Vyšší nároky na železo jsou typické zejména pro děti a dospívající nebo mladé a těhotné ženy, objevit se nicméně mohou u každého [14]. U dětí se nedostatek manifestuje především v důsledku rychlého růstu. Zpravidla k tomu dochází však až od 6. měsíce věku, protože do té doby je železo čerpáno ze zásob vytvořených během těhotenství. U dívek se nedostatek projevuje

charakteristicky během období dospívání, a to vlivem růstu a současné ztráty krve menstruací [15].

Vzhledem k tomu, že se největší množství železa uplatňuje při syntéze hemoglobinu během procesu erythropoézy, může jeho nedostatek vést až k rozvoji anémie z nedostatku železa, tzv. sideropenické anémii [13, 14]. Ta celosvětově postihuje na více než 1,2 miliardy osob [14]. Klinicky se projevuje únavou, bledostí kůže i sliznic, dušností, bolestí hlavy, závratěmi, podrážděností nebo oslabenou koncentrací. Mezi příznaky tkáňového nedostatku železa se řadí padání vlasů, snížená kvalita nehtů, slizniční změny v proximální části gastrointestinálního traktu, které mohou vyústit až v potíže s polykáním a gastritidu. U dětí nebo plodů může docházet k narušení růstu [16, 17].

Diagnostika spočívá ve vyšetření krevního obrazu. Pro sideropenickou anémii je charakteristickým diagnostickým prvkem chudokrevnost, nejprve normocytární a při poklesu hemoglobinu pod 110 g/l posléze mikrocytární – jež je vyvolána zmenšováním objemu krvinek. Laboratorně se prokazuje rovněž snížená koncentrace plazmatického železa, zvýšená hladina transferinu se sníženou saturací železem a/nebo snížená hladina feritinu, která svědčí o poklesu zásob železa v těle pacienta. Provádí se rovněž určení volného protoporfyrinu v erythrocytech, jehož hladina bývá zvýšena, či transferinových receptorů, u nichž anémie vyvolává jejich okamžitý nárůst syntézy [17].

Léčba onemocnění spočívá v nalezení příčiny anémie a krevních ztrát a ve snaze tyto příčiny odstranit, zároveň ve zvýšení příjmu železa perorální cestou [16]. Využíváno je nejčastěji železa ve formě síranu, fumarátu či glukonátu železnatého. U pacientů, kteří nereagují nebo netolerují perorální suplementaci se přistupuje k aplikaci železa intravenózní cestou [14].

3.1.3.2 Nadbytek železa a s ním související onemocnění

Za zcela opačný případ se označuje stav nadměrného hromadění železa v organismu, který definujeme jako tzv. přetížení železem [18]. Patologické stavy spojené s přetížením železem mohou mít dědičný, získaný nebo smíšený původ. Zatímco většina těchto patologických stavů souvisí s jeho systémovým přetížením, některé vznikají na podkladě hromadění železa ve specifických tkáních, buňkách

nebo subcelulárních kompartmentech ve vztahu k poruchám homeostázy železa při zachování jeho normální hladiny v organismu [19].

Hemochromatóza označuje skupinu poruch, dědičných či získaných, které sdílejí jednotný metabolický defekt, a to neschopnost regulovat vstup nadbytečného množství železa do systémového oběhu. Společným patogenetickým základem všech forem je nedostatečná syntéza či aktivita hormonu hepcidinu [19, 20]. Ta vyúsťuje v nepřiměřeně vysokou střevní absorpci železa vzhledem k jeho tělesným zásobám a převyšuje jeho ztráty zhruba o 3 mg za den [20]. Následkem toho dochází k hromadění přebytečného železa v orgánech a tkáních, jež vyvolává jejich poškození a z toho řadu vyúsťujících zdravotních problémů [21].

Nejčastější forma hemochromatózy je tzv. hereditární hemochromatóza (HC) způsobená mutacemi HFE genu, který ovlivňuje metabolismus železa v lidském těle a expresi hepcidinu [21]. Dvě genové mutace tohoto genu, C282Y a H63D, jsou v patogenezi považovány za nejvýznamnější [17]. Klinicky se HC manifestuje slabostí, únavou, jaterním poškozením, diabetem mellitem, pigmentací kůže a kardiomyopatiemi. Intenzita projevů se zvyšuje s věkem a hromaděním železa v organismu jedince. Později se vyskytuje například hepatomegalie, splenomegalie, arropatie, ascites, arytmie a další projevy akumulace železa v těle pacienta [21].

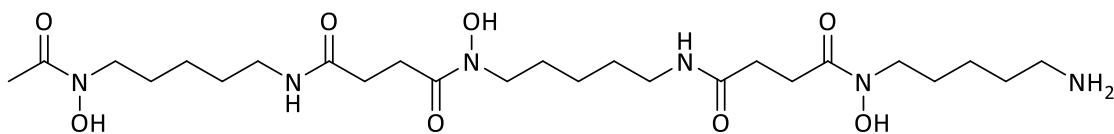
V laboratorním vyšetření lze zjistit vysokou saturaci transferinu a sérového feritinu. Onemocnění lze diagnostikovat prostřednictvím klinických projevů, v presymptomatickém období rovněž laboratorním vyšetřením zaměřujícím se na saturaci transferinu či feritinu. Zvýšená hladina feritinu se však vyskytuje i u těžkých zánětů či malignit a nemusí jasně identifikovat přítomnost právě hemochromatózy. Naopak velmi spolehlivým markerem HC je stanovení indexu jaterního železa, přítomnost mutací C282Y a H63D genu HFE, případně provedení jaterní biopsie [21].

Léčba tohoto onemocnění zahrnuje odběry krve, tzv. flebotomii. V úvodní intenzivní fázi léčby může být odebíráno až 500 ml krve 1–2krát týdně, v udržovací fázi se obvykle provádí jedna flebotomie každé tři měsíce, přičemž frekvence závisí na koncentraci feritinu konkrétního pacienta [21].

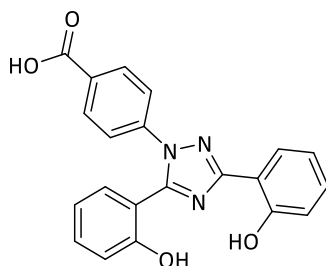
Aceruloplasminémie je vzácné autosomálně recesivní onemocnění způsobené mutací genu CP, který kóduje ceruloplasmin [19]. Tato mutace vede k úplnému nedostatku nebo k nefunkční formě ceruloplasminu, klíčového proteinu odpovědného

za mobilizaci železa z buněk a jeho transport krví. Významným důsledkem je rovněž ztráta jeho feroxidázové aktivity. Ve výsledku se železo hromadí v mozku a viscerálních orgánech organismu a zvyšuje se tak oxidační stres. Akumulace železa v orgánech vyúsťuje v jeho nedostatek v systémovém krevním oběhu a k rozvoji anémie. Excesivní hromadění železa a zvýšený oxidační stres v mozku pacienta způsobují úbytek neuronů bazálních ganglií a abnormální deformaci astrocytů a globulárních struktur. Klinicky se onemocnění vyznačuje charakteristickou triádou skládající se z neurologického postižení, degenerace sítnice a diabetu mellitu [22]. Onemocnění postupuje progresivně a může mít fatální průběh, proto je zcela zásadní jeho včasná diagnostika a léčba [19].

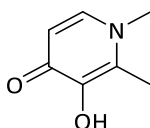
Klíčovou roli v terapii sehrávají látky chelatující železo, ať už deferoxamin, deferasirox nebo deferipron, u kterých byly prokázány povzbudivé účinky, pravděpodobně i na neurodegenerativní projevy. Jejich chemickou strukturu uvádí „*Obrázek 2*“. Přechodně uspokojivé se značí podávání chelatotvorných látek společně s čerstvě zmraženou plazmou ve snaze obnovit hladinu ceruloplasminu v těle nemocného. Podpůrnou složku terapie tvoří podávání vitaminu E nebo síranu zinečnatého, jakožto látek, které pomáhají předcházet oxidativnímu poškození tkání a zlepšují celkový stav jedince [23].



Deferoxamin



Deferasirox



Deferipron

Obrázek 2: Chemická struktura látek chelatujících železo (deferoxamin, deferasirox, deferipron).

Existuje celá řada dalších onemocnění spojených s přetížením organismu železem, která jsou však velmi vzácná. Jedná se například o hypotransferrinémii, attransferrinémii či onemocnění spojené s deficitem DMT1 či deficitem hemoxygenázy 1 (HMOX1), stejně tak neuroferritinopatie, Friedreichova ataxie a genetická anémie spojená s nadbytkem železa v organismu [19].

3.2 Oxidační stres

Schopnost železa snadno přijímat nebo odevzdávat elektrony a účastnit se redoxních reakcí ho činí pro organismus nejen naprosto nezbytným, ale rovněž i potenciálně toxickým [24]. Při narušení homeostázy železa směrem k nadbytku přispívá železo k tvorbě reaktivních hydroxylových radikálů a z toho vyplývajícimu rozvoji oxidačního stresu [25].

Oxidační stres představuje biologický proces spojený s nadměrnou produkcí volných radikálů a reaktivních metabolitů, tedy reaktivních forem kyslíku (ROS) a reaktivních forem dusíku (RNS). Tento jev vzniká v důsledku narušené rovnováhy mezi produkcí volných radikálů a reaktivních metabolitů a jejich neutralizací antioxidantními systémy organismu. Úzce souvisí s poškozením důležitých biomolekul a orgánů, stejně jako s patogenetickými mechanismy řady onemocnění, včetně procesů stárnutí [26, 27]. ROS a RNS představují souhrnný termín pro volné radikály a další neradikálové reaktivní deriváty kyslíku a dusíku, tzv. oxidanty, které vykazují oxidační aktivitu a přispívají k reakcím volných radikálů. Jejich přehled uvádí „*Tabulka 1*“ [27]. Volným radikálem lze označit vysoce nestabilní molekulu s jedním nebo více nespárovanými elektrony ve svém valenčním obalu, které umožňují reakci s organickými substráty a vyvolávají poškození DNA, modifikaci proteinů či peroxidaci lipidů v organismu [27, 28].

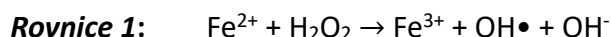
Tabulka 1: Přehled reaktivních forem kyslíku (ROS) a reaktivních forem dusíku (RNS) [27].

Reaktivní formy kyslíku (ROS)	
Volné radikály	Hydroxylový radikál (OH•), superoxidový aniont (O ₂ • ⁻), peroxylový radikál (ROO•), lipid peroxylový radikál (LOO•)
Reaktivní deriváty kyslíku	Peroxid vodíku (H ₂ O ₂), ozon (O ₃), singletový kyslík (¹ O ₂), kyselina chlorná (HOCl)
Reaktivní formy dusíku (RNS)	
Volné radikály	Oxid dusnatý (NO•), oxid dusičitý (NO ₂ •)
Reaktivní deriváty dusíku	Kyselina dusitá (HNO ₂), peroxyinitrit (ONOO ⁻), dinitrogen trioxid (N ₂ O ₃)

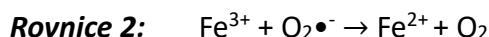
Nadměrné koncentrace ROS a RNS vedou k oxidativnímu poškození biologických systémů. Pokud se v organismu nacházejí v nízkých až středních koncentracích, mohou mít i prospěšné účinky. Při těchto hladinách totiž hrají klíčovou roli v řadě buněčných procesů, podporují funkci imunitního systému a eliminaci patogenů [27].

3.3 Fentonova reakce

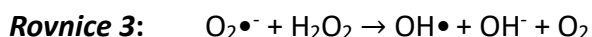
V návaznosti na uvedené informace je patrné, že se nadbytek železa a jeho redoxní schopnosti přímo uplatňují v procesu, v němž vznikají nejreaktivnější ROS, hydroxylové radikály (OH•). Tento proces je označován jako tzv. Fentonova reakce. Jedná se o reakci mezi peroxidem vodíku (H₂O₂) a železem (Fe²⁺) za vzniku právě zmiňovaného hydroxylového radikálu, jak znázorňuje „*Rovnice 1*“ [29, 30].



Regeneraci trojmocného železa Fe³⁺, jež při reakci vzniká, zpět na železo dvojmocné Fe²⁺ zajišťuje superoxidový aniont (O₂•⁻), který vystupuje jako reduktant (*Rovnice 2*). Superoxid tímto způsobem zprostředkovává další propagaci Fentonovy reakce a šíření oxidačního působení vznikajících hydroxylových radikálů [29, 30].



Fentonova reakce tvoří součást tzv. Haber-Weissovy chemie, přičemž Haber-Weissova reakce je souhrnně popisována jako interakce superoxidu (O₂•⁻) a peroxidu vodíku (H₂O₂) katalyzovaná ionty kovů za vzniku reaktivního hydroxylového radikálu (OH•) (*Rovnice 3*) [31].



3.4 Antioxidanty

Lidský organismus vykazuje schopnost čelit oxidačnímu stresu a potenciální toxicitě ROS a RNS prostřednictvím antioxidantů, které jsou buď přirozeně syntetizovány v organismu jako tzv. endogenní antioxidanty, nebo přijímány z vnějších zdrojů prostřednictvím potravy či doplňků stravy jako tzv. exogenní antioxidanty. Jejich úloha spočívá v neutralizaci nadbytečného množství volných radikálů, čímž brání jejich škodlivému působení a poškození organismu, případně napomáhají již vzniklá poškození opravovat [26, 27].

Antioxidanty lze dále klasifikovat na enzymatické a neenzymatické. K enzymatickým antioxidantům lze přiřazovat superoxiddismutázu (SOD), katalázu (CAT), glutathionperoxidázu (GPx) a glutathionreduktázu (GRx). SOD katalyzuje přeměny superoxidového aniontu na méně škodlivý peroxid vodíku. Tento peroxid vodíku může být následně prostřednictvím CAT nebo GPx transformován až na vodu a kyslík. GRx se podílí na eliminaci peroxidu vodíku a lipidových a nelipidových hydroperoxidů tím, že je využívá k oxidaci redukováného glutathionu na jeho oxidovanou formu. Neenzymatické antioxidanty lze rozdělit na dvě podskupiny: metabolické, které produkuje samotný organismus, a nutriční, které jsou přijímány z vnějšího prostředí. Mezi neenzymatické metabolické antioxidanty lze řadit například kyselinu lipoovou, L-arginin, glutathion, melatonin, koenzym Q10, kyselinu močovou, bilirubin, transferin a řadu dalších tělem syntetizovaných jednotek. Neenzymatické nutriční antioxidanty představují například vitamín E, vitamín C, karotenoidy, stopové prvky nebo flavonoidy [27].

3.5 Flavonoidy

Flavonoidy tvoří rozsáhlou skupinu přírodních produktů – sekundárních metabolitů rostlin. Sekundární metabolity, na rozdíl od metabolitů primárních, nejsou pro život rostlinné buňky nezbytné, hrají však klíčovou roli v její interakci s vnějším prostředím a zabezpečují ochranu proti biotickým a abiotickým vlivům [32]. Flavonoidy jsou v rostlinách zodpovědné za celou řadu významných funkcí. Působí jako signální molekuly, detoxikační činidla, UV filtry, stimulanty klíčení semen a spór, spolupodílejí se na aklimatizaci rostliny na vnější teplotu a sucho, a lákají opylovače. Stejně tak slouží jako alelochemická činidla, nebo se zapojují do procesu genové fixace a růstu rostlin [33, 34, 35]. Jejich syntézu podněcuje široká škála faktorů, jako je například oxidační stres, mikrobiální infekce nebo UV-A a UV-B záření [36]. Do současné chvíle bylo identifikováno na 6000 flavonoidů [34].

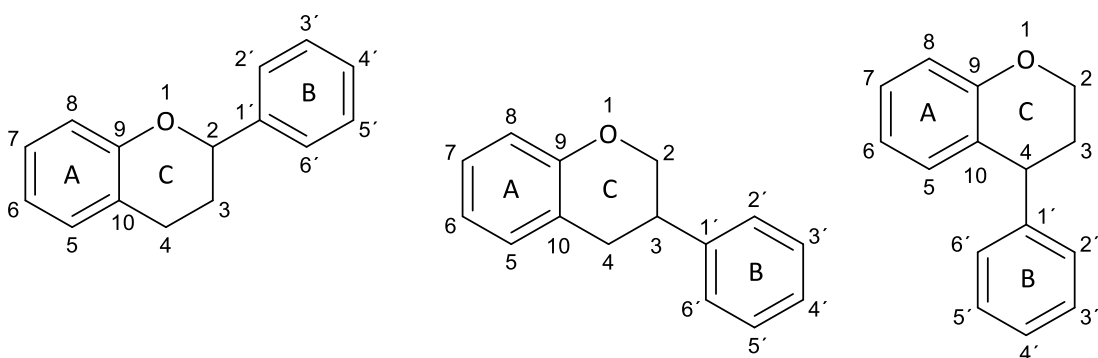
V rostlinné říši jsou flavonoidy hojně rozšířeny, nejčastěji se nachází v ovoci, zelenině, obilovinách, ořechách, květinách nebo semenech. V rostlinách se vyskytují ve všech částech, od kořene, stonku až po listy, květy a plody. Nachází se také v řadě potravin a nápojů rostlinného původu a jejich konzumace pro lidské tělo

přináší celou škálu zdravotních benefitů a léčebných účinků [34, 37]. V závislosti na stravovacích návycích každého jedince se příjem flavonoidů pohybuje mezi 50 mg až 1 g za den [38].

V lidském organismu působí flavonoidy především antioxidačním efektem, čímž brání vzniku poškození vyvolaných volnými radikály. Vykazují také protizánětlivé, protinádorové, antiangiogenní, antiproliferační, antimikrobiální, antivirové nebo neuroprotektivní schopnosti. Napomáhají rovněž předcházet kardiometabolickým poruchám a podílejí se na zachování kognitivních funkcí [39, 40].

3.5.1 Chemická struktura a klasifikace flavonoidů

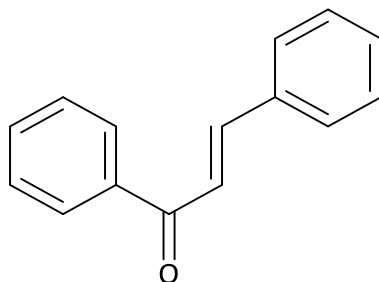
Flavonoidy jsou z chemického hlediska polyfenolické látky, přesněji deriváty 2-fenylchromanu, tzv. flavanu. Jejich základní struktura, kterou znázorňuje „Obrázek 3“, se skládá z patnáctiuhlíkatého skeletu C₆-C₃-C₆ založeného na dvou benzenových kruzích (kruh A a B), jež jsou spojeny heterocyklickým pyranovým kruhem či jeho dihydroderivátem (kruh C) [40, 41]. S ohledem na polohu benzenového substituentu (kruhu B) lze rozlišovat isoflavonoidy s benzenovým substituentem v poloze C3 a neoflavonoidy s benzenovým substituentem v poloze C4 kruhu C. Vůbec nejčastější jsou však flavonoidy s polohou benzenového substituentu na C2 [34]. Flavonoidy se dále klasifikují na různé podskupiny v závislosti na způsobu substituce a stupni oxidace kruhu C. Dělí se na chalkony, flavanony, flavony, isoflavony, flavonoly, flavanoly a anthocyany. Sloučeniny v rámci jednotlivých podskupin se vzájemně liší rovněž způsobem substituce kruhů A a B [34, 39, 40].



Obrázek 3: Základní chemická struktura flavonoidů, isoflavonoidů a neoflavonoidů.

V přírodě se flavonoidy nacházejí jako aglykony či glykosylované nebo methylované deriváty [40, 42]. Glykosylované deriváty vznikají navázáním cukerného zbytku na strukturu flavonoidní sloučeniny glykosidickou vazbou, a to převážně do polohy C3 nebo C7 v případě O-glykosidů a do polohy C6 a C8 v rámci C-glykosidů [35, 43]. Nejčastěji se uplatňuje L-rhamnosa, D-glukosa, glukorhamnosa, galaktosa a arabinosa [40]. Zatímco glykosylace usnadňuje transport flavonoidů přes membránu buněk, zvyšuje rozpustnost, zlepšuje jejich distribuci a metabolismus, methylace zvyšuje vstup flavonoidních sloučenin do buněk a tím i jejich ochranu [42].

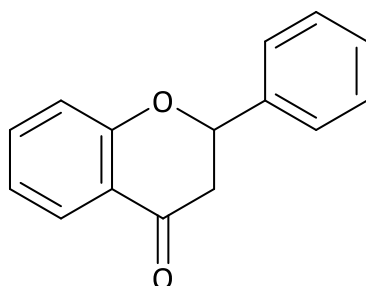
Chalkony (Obrázek 4) představují flavonoidní sloučeniny s otevřeným řetězcem, respektive sloučeniny s absencí kruhu C [34]. Zároveň se jedná o prekurzory flavonoidů a isoflavonoidů [44]. Ve významném množství se vyskytují v rajčatech, hruškách nebo jahodách. Hlavními představiteli této skupiny jsou floridzin, floretin a chalconaringenin [34]. Projevují široké spektrum farmakologických účinků, mezi které patří antioxidační, antiulcerózní, antikancerogenní, antibakteriální, anthelmintické, antivirové a antiprotozoální působení [44].



Obrázek 4: Základní chemická struktura chalkonů.

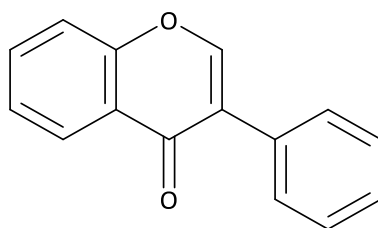
Flavanony (Obrázek 5) s nasyceným C kruhem se označují rovněž jako tzv. dihydroflavony. Právě tento charakteristický strukturní znak, nasycená vazba mezi C2 a C3, je odlišuje od ostatních flavonoidních tříd [45]. Vyskytují se téměř ve všech citrusových plodech, některých aromatických rostlinách a rajčatech [37]. Mezi hlavní představitelé skupiny lze zařadit hesperidin, naringenin nebo eriodyktiol [37, 45]. Využívány jsou zejména pro své pozitivní účinky na lipidové

spektrum a z toho vyplývající prevenci kardiovaskulárních onemocnění [37]. Hesperidin zároveň dominuje svým antioxidačním, chelatačním a neuroprotektivním potenciálem a společně s flavonem diosminem se využívá k léčbě poruch žilního oběhu, jako jsou otoky, bolesti nebo křeče nohou a příznaků způsobených akutním hemoroidálním záchvatem [46].



Obrázek 5: Základní chemická struktura flavanonů.

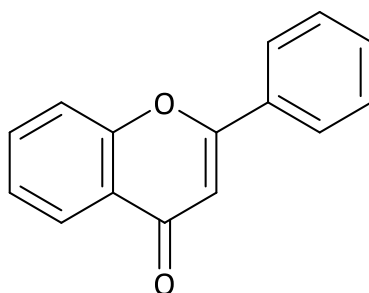
Isoflavony (Obrázek 6) jsou podskupinou isoflavonoidů, které, jak již bylo uvedeno výše, se chemicky odlišují od ostatních flavonoidů umístěním benzenového substituentu v poloze C3 kruhu C [44]. Díky tomu vykazují strukturální podobnost s ženskými pohlavními hormony estrogeny a mohou tak interagovat s estrogenními receptory. Souhrnně jsou proto označovány jako tzv. fytoestrogeny. Kromě toho, že napomáhají potlačovat symptomy menopauzy a pravděpodobně dominují i svými chemoprotektivními schopnostmi, mají rovněž silné antioxidační účinky. Hlavním zdrojem isoflavonů je sója a sójové produkty, ale i další luštěniny. Charakteristickými zástupci jsou daidzein, genistein a glycitein [37, 44].



Obrázek 6: Základní chemická struktura isoflavonů.

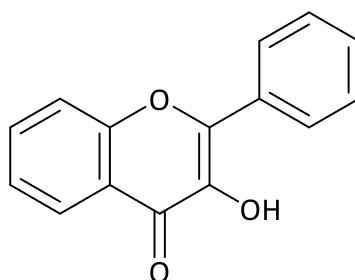
Flavony (Obrázek 7) tvoří jednu z nejvýznamnějších podskupin flavonoidů. Jejich charakteristickým znakem je dvojná vazba mezi C2 a C3 a ketonická skupina

v poloze C4 kruhu C [45]. Flavony jsou přítomné zejména v listech, květech a plodech celé řady rostlin, jako je například celer, petržel, červená paprika, máta, heřmánek či *Ginkgo biloba*. Vyskytují se většinou jako 7-O-glykosidy. K zástupcům flavonů se zařazují například apigenin, luteolin či chrysin, které vykazují antioxidační a antiflogistické účinky [44, 45].



Obrázek 7: Základní chemická struktura flavonů.

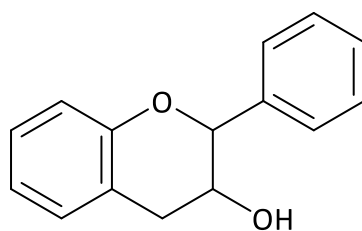
Flavanoly (Obrázek 8) po chemické stránce představují 3-hydroxyderiváty flavonů obsahující hydroxylovou skupinu na C3 kruhu C [47]. Představují stavební prekurzory proanthocyanidinů. Do určité míry podléhají glykosylaci a methylaci. Glykosylace směřuje do pozice C7 kruhu A a C3 kruhu C. K flavonolovým glykosidům se přiřazuje například kempferol, kvercetin, myricetin, limocitrin a isorhamnetin [45]. Vykazují nejen antioxidační schopnosti, ale také kardioprotektivní, antikancerogenní, antibakteriální nebo antivirové účinky [44, 45].



Obrázek 8: Základní chemická struktura flavanolů.

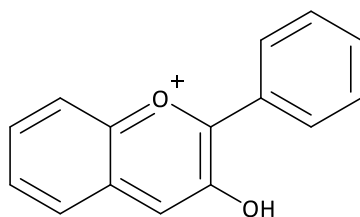
Flavanoly (Obrázek 9) tvoří rozsáhlou skupinu flavonoidů – od monomerních flavan-3-olů, jež jsou označovány jako katechiny a epikatechiny, po oligomery a polymery, tzv. kondenzované taniny. Jednotliví zástupci se vzájemně liší polohou

a počtem hydroxylových skupin na kruhu A, B a C. Vyskytují se převážně v ovoci, jako jsou jablka, meruňky, bobuloviny a kiwi, dále ve slupkách nebo semenech ovoce a zeleniny, v čaji a v červeném víně. Pravidelná konzumace potravin s vysokým obsahem flavanolů přispívá ke zlepšení endoteliálních funkcí, prevenci kardiovaskulárních onemocnění a potenciálně může vést i ke zvrácení poruch funkce cév souvisejících s kouřením, a to prostřednictvím schopnosti zvyšovat hladiny oxidu dusnatého v krvi [39, 48].



Obrázek 9: Základní chemická struktura flavanolů.

Anthocyany (Obrázek 10) představují skupinu rozpustných vakuolárních pigmentů zodpovědných za tvorbu široké škály barev rostlin. Chemicky se jedná o glykosylované polyfenolické sloučeniny (glykosylované formy anthocyanidinů), které se odlišují od mnohých flavonoidních sloučenin absencí ketonické skupiny v poloze C4 kruhu C. Objevují se ve vnější vrstvě buněk ovoce a zeleniny, například v borůvkách, červeném zelí, lilku a rajčatech [39, 45]. Dominují zejména svou antioxidační schopností, stejně tak hrají klíčovou roli v prevenci kardiovaskulárních onemocnění a ve zlepšení lipidového spektra a ostrosti zraku. Běžně se využívají jako potravinářská barviva. K nejznámějším zástupcům anthocyanů patří cyanidin, delphinidin, malvidin, pelargonidin, petunidin, peonidin a jejich odpovídající deriváty [39].



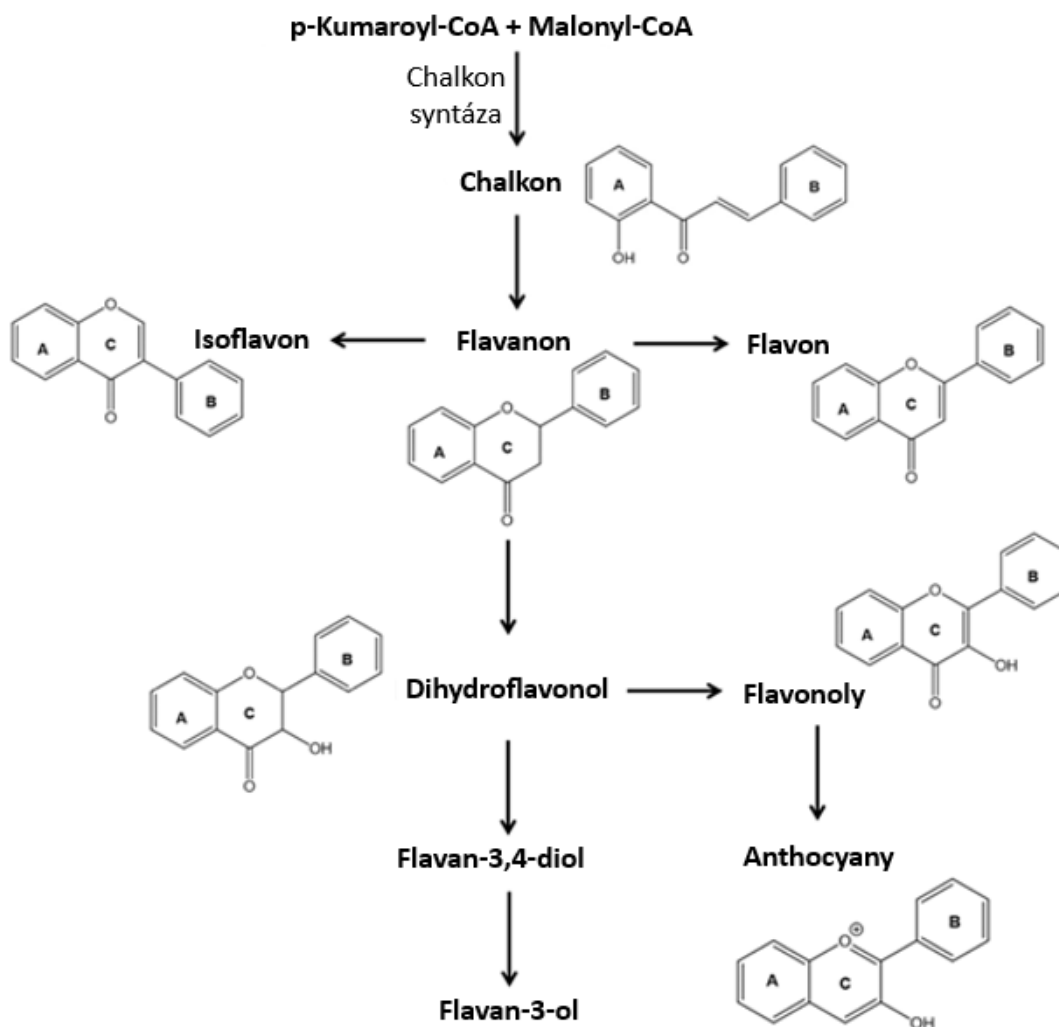
Obrázek 10: Základní chemická struktura anthocyanů.

3.5.2 Biosyntéza flavonoidů

Biosyntéza flavonoidů (Obrázek 11) probíhá z fenylalaninu. Tato aromatická aminokyselina, která pochází z šikimátové dráhy, je nejprve deaminována na kyselinu *trans*-skořicovou prostřednictvím fenylalanin-amoniak-lyázy (PAL). Další krok řídí monooxygenáza cytochromu P450 rostlin, přesněji cinnamoyl-4-hydroxyláza (C4H) zabezpečující hydroxylaci *trans*-skořicové kyseliny na kyselinu *p*-kumarovou. Tato kyselina je transformována 4-kumarát-CoA-ligázou (4CL) na *p*-kumaroyl-CoA. Uvedené kroky přeměny fenylalaninu na *p*-kumaroyl-CoA lze označit za obecnou fenylpropanoidní dráhu společnou pro všechny flavonoidní sloučeniny [36, 40].

Molekula *p*-kumaroyl-CoA společně se třemi molekulami malonylu-CoA, jehož původ tvoří polyketidová dráha, je následně využita k syntéze chalkonu jakožto prvního klíčového intermediárního produktu biosyntézy flavonoidů [36, 40]. Chalkon isomeráza následně zprostředkovává intramolekulární cyklizaci chalkonů na flavanony za tvorby charakteristického heterocyklického kruhu C. Z flavanonů jsou následně produkovány flavony, a to pomocí flavon syntázy a tvorby dvojné vazby mezi C2 a C3 kruhu C, nebo isoflavony prostřednictvím isoflavanon syntázy, která zajišťuje přemístění kruhu B z pozice C2 na pozici C3. Vznik isoflavonů je dokončen prostřednictvím hydroxyisoflavanon dehydratázy. Za další klíčový intermediát se považuje flavanonol, neboli dihydroflavonol, jakožto prekurzor dalších podtříd flavonoidů – flavonolů, anthocyanidinů a proanthocyanidinů. Jeho produkce vychází z flavanonu a zprostředkovává ji flavanon-3-hydroxyláza [36].

Biosyntéza konkrétních sloučenin jednotlivých flavonoidních podskupin je dokončena různými enzymatickými reakcemi, přesněji hydroxylací, methylací, glykosylací, acylací a polymerizací. Tyto modifikace vedou ke specifickým úpravám základní flavonoidní chemické struktury, čímž zásadně ovlivňují jejich fyzikálně-chemické vlastnosti a biologické účinky [38, 40, 49].



Obrázek 11: Syntéza flavonoidů - převzato a upraveno [42].

3.5.3 Absorpce flavonoidů

Aby polyfenolické látky, včetně flavonoidů, přijímané potravou vyvolaly požadované účinky, je nezbytné, aby se absorbovaly z trávicího traktu. Malá část těchto bioaktivních látek se vstřebává v nezměněné formě, převážné množství se však absorbuje až po biotransformaci v tenkém střevě nebo působením mikroflóry ve střevě tlustém [50].

Flavonoidní sloučeniny se vzájemně liší různou měrou, rychlostí absorpce a biologickou dostupností. Zatímco mezi nejlépe vstřebatelné flavonoidy patří isoflavony, za středně vstřebatelné lze považovat flavanoly, flavanony a flavonolové glykosidy. Vůbec nejhůře vstřebatelnými jsou anthocyany a proanthocyanidiny [35].

Před vlastní absorpcí se jednotlivé flavonoidy nejprve uvolňují z rostlinné potravinové matrice žvýkáním, působením trávicích šťáv a mikroorganismů trávicího traktu [51]. Uvolňování z matrice a následná absorpce je závislá na druhu rostlinné potravin, způsobu jejího zpracování, přítomnosti dalších složek potravy, ale rovněž i na samotných fyzikálně-chemických vlastnostech flavonoidů, dále na pohlaví, individuálních genetických vlastnostech každého jedince a mikrobiálním osídlení tlustého střeva [35, 51]. Za fyzikálně-chemické vlastnosti flavonoidů ovlivňující vstřebávání lze považovat velikost a konfiguraci molekuly, lipofilitu, rozpustnost nebo pKa [51].

Místo vstřebávání potravou přijímaných flavonoidů se liší v závislosti na jejich chemické struktuře [38]. V potravě se flavonoidy nacházejí nejčastěji ve formě β -glykosidů [51]. Převážná většina odolává kyselému prostředí žaludku a v neporušené formě přechází do dvanáctníku tenkého střeva, případně až do střeva tlustého [52]. β -glykosidy před vstřebáním podléhají deglykosylaci β -glukosidázami tenkého střeva. U člověka byly detekovány tři typy β -glukosidáz, a to vysoce specifická cytosolová β -glukosidáza, laktáza-florizin hydroláza (LPH) a glukocerebrosidáza (CBG). Hydrolýzou sacharidové části vznikají aglykony, které následně pasivně difundují epiteliálními buňkami tenkého střeva [35]. Některé glykosylované flavonoidy však nejsou substráty zmiňovaných β -glukosidáz. Proto u těchto glykosidů dochází k transportu až do tlustého střeva, kde jsou posléze modifikovány bakteriální mikroflórou na vstřebatelné flavonoidní aglykony a další katabolické produkty s nižší molekulovou hmotností [51, 53, 54]. Jelikož je absorpční kapacita tlustého střeva v porovnání s tenkým střevem menší, lze předpokládat pouze omezené vstřebání [51]. U některých glykosylovaných flavonoidů se uplatňuje aktivní transportní mechanismus využívající sodno-dependentní glukózový transportér (SGLT1) [35, 51].

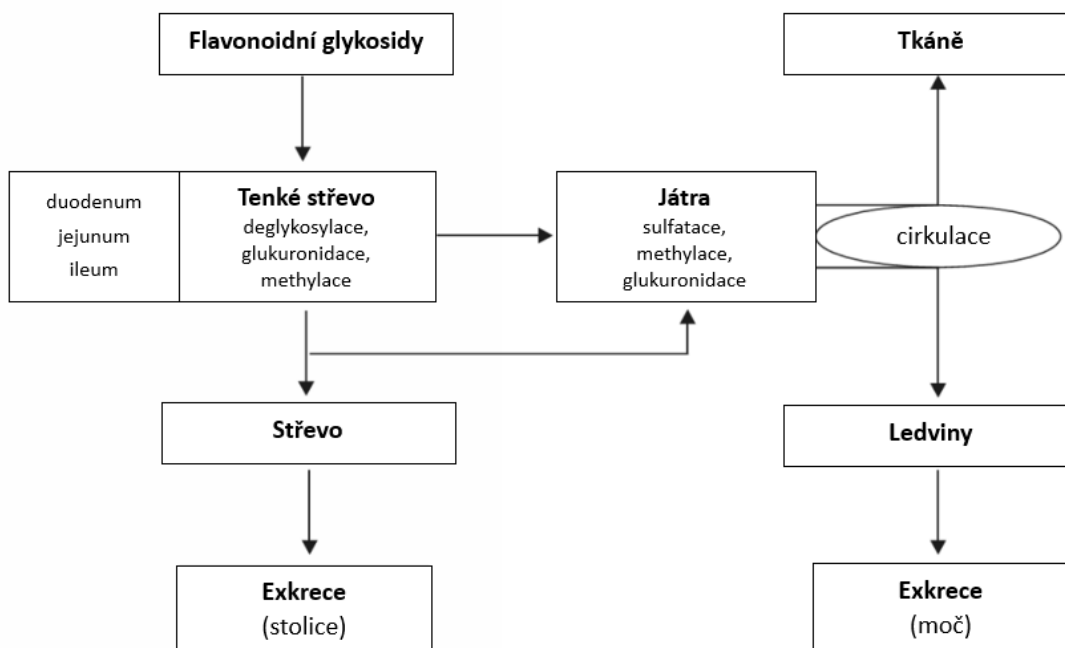
Z hlediska vstřebávání se od ostatních flavonoidních tříd částečně odlišují flavanoly. Ty jsou na rozdíl od ostatních sloučenin v potravinách přítomny ve formě monomerních aglykonů nebo oligomerních proanthocyanidinů. Zatímco aglykony se přímo vstřebávají z tenkého střeva, oligomery podléhají hydrolýze na příslušné vstřebatelné monomery a dimery [51].

Absorpci a rozsah biologické dostupnosti některých flavonoidů limituje střevní eflux. Střevní eflux představuje proces, v rámci kterého se enterocyty absorbované

látky aktivně transportují zpět do střevního lumen. Na regulaci tohoto mechanismu se podílí členové nadrodiny transportérů vázající adenosintrifosfát (ATP) (ABC), přesněji protein multirezistence (MRP), protein rezistence vůči rakovině prsu (BCRP) a P-glykoprotein (P-gp). V konečném důsledku tak dochází ke snížení množství látky, která se dostane do systémového oběhu, a tím ovlivnění její absorpce, biodostupnosti, a vzhledem k přítomnosti ABC transportérů v buněčných membránách celého organismu i distribuci do míst působení a jejich eliminaci [35].

3.5.4 Metabolismus flavonoidů

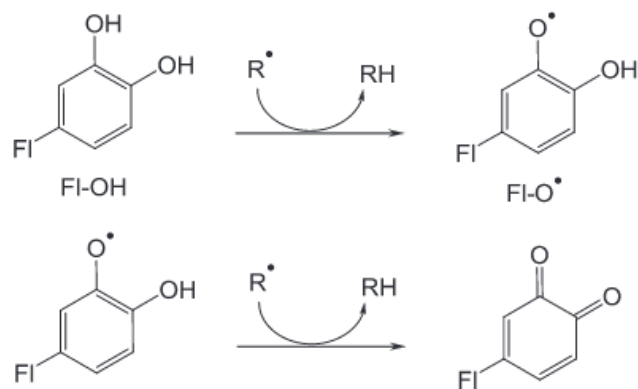
Flavonoidy před vstupem do systémového oběhu podléhají enzymatickému působení tenkého střeva, jater a tlustého střeva. Vlivem přítomných enzymů dochází k oxidaci, redukci, hydrolýze a konjugaci flavonoidních látek na výsledné *O*-glukuronidy, sulfátové estery a *O*-methylestery. Konjugace probíhá nejdříve v tenkém střevě prostřednictvím uridin-5'-difosfát glukuronosyltransferáz (UGT), sulfotransferáz (SULT) a katechol-*O*-methyltransferáz (COMT). Po střevní absorpci a metabolismu jsou flavonoidy transportovány vazbou na albumin portální žilou do jater, kde dochází k další transformaci výše zmiňovanými enzymy za vzniku výsledných glukuronidů a sulfátových derivátů vylučovaných močí a žlučí. Metabolizací vznikající produkty vylučované žlučí podléhají enterohepatálnímu oběhu. Prostřednictvím enzymů mikrobioty tlustého střeva jsou degradovány na opětovně vstřebatelné aglykony nebo další katabolity s nižší molekulovou hmotností vznikající rozštěpením heterocyklického kruhu [35, 53]. Hlavními katabolickými produkty jsou kyseliny fenylactové, benzoové a fenylpropionové [50]. Působení mikroflóry tlustého střeva je vystaven i podíl flavonoidů, který se nevstřebává v tenkém střevě [53]. Schéma metabolismu flavonoidů zobrazuje „*Obrázek 12*“.



Obrázek 12: Metabolismus flavonoidů – převzato a upraveno [35].

3.5.5 Antioxidační a pro-oxidační účinky flavonoidů

Antioxidační účinky flavonoidů spočívají ve schopnostech neutralizovat ROS nebo potlačovat jejich tvorbu, zároveň v účinné chelataci iontů kovů (železa a mědi) a aktivaci antioxidační obrany [40, 42]. Klíčovou roli v antioxidačním působení sehrávají jednotlivé substituenty vázané na základní jaderné flavonoidní strukturu. V závislosti na typu funkčních skupin a jejich uspořádání se antioxidační aktivita zástupců flavonoidních tříd vzájemně liší [42]. Přesněji, schopnost vyladit volné radikály se přisuzuje vysoce reaktivním hydroxylovým funkčním skupinám, které volným radikálům poskytují elektron a vodíkový atom [42, 55]. Tímto způsobem dochází ke stabilizaci volných radikálů a vzniku relativně stabilních radikálů flavonoidních, které mohou dále interagovat s dalšími flavonoidními radikály a získávat tak stabilní chinonovou strukturu, jak popisuje rovnice na „Obrázek 13“ [55].



Obrázek 13: Vychytávání volných radikálů flavonoidy [55].

(FI-OH: flavonoid; R•: volný radikál; FI-O•: flavonoidní fenoxylový radikál)

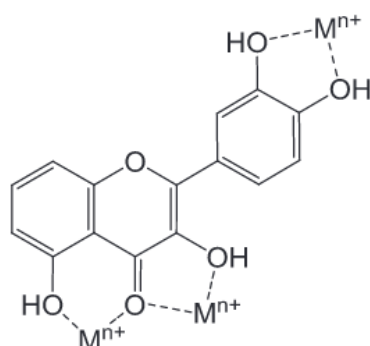
Zvláště důležitá je v tomto procesu hydroxylová skupina na pozici C3 C-kruhu (3-OH) a *ortho*-dihydroxy skupina B-kruhu. 3-OH skupina podporuje planární uspořádání molekuly. Planarita ve výsledku zvyšuje stabilitu nově vznikajícího flavonoidního radikálu a zlepšuje antioxidační vlastnosti. Absence 3-OH skupiny účinek snižuje. Vliv tohoto substituentu potencuje přítomnost hydroxylových skupin na B-kruhu, které vytvářejí s 3-OH skupinou intramolekulární vodíkové vazby a podporují delokalizaci elektronů. Tím dochází ke stabilizaci rovinného uspořádání molekuly a ke zvýšení antioxidačních schopností. Přítomnost další hydroxylové skupiny na B-kruhu účinek dále zvyšuje, naopak přítomnost pouze jedné hydroxylové skupiny aktivitu snižuje [56, 57].

Dalším významným strukturním rysem antioxidačního působení je nenasycená vazba mezi C2 a C3 v konjugaci se 4-oxo skupinou C-kruhu, která přispívá k rezonančnímu účinku aromátu a zodpovídá za stabilizaci vznikajících flavonoidních radikálů. Sloučeniny postrádající tuto nenasycenou vazbu nebo 4-oxo skupinu vykazují slabší antioxidační působení [40, 56, 57].

Odlišnosti v antioxidačním působení nastávají i mezi polyhydroxylovanými a polymethoxylovanými flavonoidy. Důvodem je, že *O*-methylace může sterickeým efektem narušovat planaritu látky, čímž omezuje konjugaci elektronů klíčovou pro stabilizaci radikálů, a tím i vlastní antioxidační účinky [56].

U glykosylovaných flavonoidů lze očekávat nižší antioxidační účinek než v případě jejich odpovídajících aglykonů. Obdobným způsobem jako u methylace dochází k narušení koplanarity B-kruhu se zbytkem struktury [56].

Antioxidační působení ve smyslu chelatace iontů kovů za tvorby stabilních komplexů vykazují flavonoidy prostřednictvím svých vazebných míst, které znázorňuje „Obrázek 14“. Jedná se o *ortho*-dihydroxy skupinu B-kruhu, 3-OH a 4-oxo skupinu C-kruhu nebo 5-OH a 4-oxo skupinu kruhu A a C [55]. Velmi silným vazebným místem pro železo je rovněž 6,7-dihydroxyskupina [58].



Obrázek 14: Vazebná místa pro ionty kovů [55].

Jiným možným mechanismem antioxidačního působení flavonoidů je jejich interakce s antioxidačními enzymy, například NAD(P)H-chinon oxireduktázou (NQO), glutathion-S-transferázou (GST) a UDP-glukuronosyltransferázou (UGT). Tyto obranné enzymy proti elektrofilním toxickým látkám a oxidačnímu stresu mohou být indukovány flavonoidními látkami, a následně se tak výrazněji uplatňovat v ochraně organismu [55].

Obdobně jako jiné antioxidanty mohou i flavonoidy za určitých okolností vykazovat **pro-oxidační účinky**. Vlivem této aktivity mají schopnost vyvolat oxidativní poškození reakcemi s biomolekulami organismu, jako jsou lipidy, proteiny a DNA [55].

Pro-oxidační aktivitu flavonoidů *in vivo* lze považovat za významnou v případech, pokud se v oxidačních procesech uplatňují volné ionty přechodných kovů. Flavonoidy mají vedle své chelatační schopnosti totiž také schopnost redukovat kovové ionty, jako je železo (Fe^{3+} na Fe^{2+}), a zprostředkovat tak vznik iniciačních radikálů prostřednictvím dříve uváděné Fentonovy reakce [55].

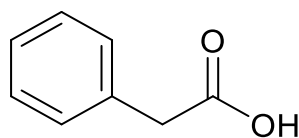
3.6 Testované látky

Část flavonoidů přechází do tlustého střeva, kde podléhá enzymatické biotransformaci přítomnou mikroflórou na aglykony a další katabolické produkty, přesněji jednoduché fenolické látky odvozené od A a B-kruhu po štěpení flavonoidního C-kruhu, jako jsou valerolaktony, fenypropionové, benzoové a fenylactové kyseliny s různým stupněm hydroxylace, které obecně dosahují vyšších plazmatických hladin než jejich mateřské flavonoidní sloučeniny [59].

Níže jsou uvedeny a charakterizovány vybrané fenylactové kyseliny, které byly testovány v rámci experimentální části této diplomové práce.

3.6.1 Fenylactová kyselina

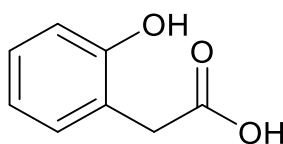
Z hlediska chemické struktury se jedná o monokarboxylovou kyselinu, v jejíž molekule je karboxylová funkce spojena s aromatickým kruhem methylenovou skupinou (*Obrázek 15*) [60]. Kyselina fenylactová byla detekována jako střevní metabolit flavonoidu kvercetin a jeho glykosidu – rutinu, a to po orálním podání extraktu z morušových listů potkanům [61]. Rovněž byla popsána jako *in vitro* produkt metabolismu střevní mikrobioty flavonoidních sloučenin katechinu, epikatechinu a proanthocyanidinů [62]. V rostlinné říši zastává funkci auxinového fytohormonu, jinými slovy zabezpečuje stimulaci růstu rostlin [63, 64]. V živočišné říši představuje endogenní produkt, který se přirozeně vyskytuje v nízkých koncentracích v organismu savců. Metabolicky se přeměňuje na konjugát s glutaminem, tzv. fenylacetylglutamin, jakožto netoxickou dusíkatou sloučeninu, která je vylučována močí. Organismus využívá fenylacetylglutamin k odstraňování případného nadbytku dusíku [50]. Z tohoto důvodu se kyselina fenylactová, respektive fenylacetát sodný, používá jako doplněk léčby akutní hyperamonémie a s ní spojené encefalopatie u nemocných s deficitem enzymů močovinového cyklu [50, 64]. Pro řadu léčiv, například ibuprofen, diklofenak a flurbiprofen se kyselina fenylactová stala základním stavebním kamenem. Uplatnění v terapii našly i její esterové a amidové deriváty, například cyklopentolát a atenolol. Fenylacetamidová skupina je také podjednotkou dalších molekul léčiv, včetně penicilinu G [64].



Obrázek 15: Fenylactová kyselina.

3.6.2 2-hydroxyfenylactová kyselina

Kyselina 2-hydroxyfenylactová je z chemického hlediska kyselinou octovou, u níž byl jeden methylový vodík substituován 2-hydroxyfenylovou skupinou (*Obrázek 16*) [65]. Tato sloučenina se přirozeně vyskytuje ve vyšších rostlinách rodu *Astilbe* čeledi Saxifragaceae [66]. Představuje rovněž minoritní metabolit kumarinu [67]. Disponuje pravděpodobně schopností inhibovat aldóza-reduktázu, enzym katalyzující přeměnu cukrů (glukosy) na polyoly (sorbitol), který se uplatňuje zejména za podmínek hyperglykémie a podporuje akumulaci sorbitolu v mnoha tkáních organismu, čímž přispívá ke vzniku diabetických komplikací [68].

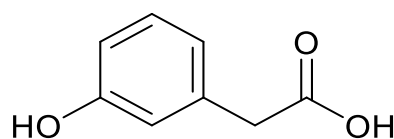


Obrázek 16: 2-hydroxyfenylactová kyselina.

3.6.3 3-hydroxyfenylactová kyselina

Kyselina 3-hydroxyfenylactová se od předchozí sloučeniny liší polohou hydroxylové funkce, která je směřována na uhlík číslo 3 aromatického jádra (*Obrázek 17*) [65]. Byla identifikována jako jeden ze střevních metabolitů flavonoidů detekovaných v moči potkanů po perorálním podání extraktu z *Ginkgo biloba* [69]. Stejně tak po orálním podání extraktu z morušových listů [61]. Přesněji se jedná o střevní metabolit flavonolu kvercetin a jeho glykosylovaných derivátů – rutinu a hyperosidu. V rámci střevního metabolismu pravděpodobně vzniká dehydroxylací kyseliny 3,4-dihydroxyfenylactové [70]. Ze stravy lze kyselinu 3-hydroxyfenylactovou přijímat bobulovinami (borůvky, brusinky, černý rybíz, arónie), po jejichž konzumaci byla detekována v lidské plazmě a následně v moči [71]. Tato kyselina vykazuje účinek

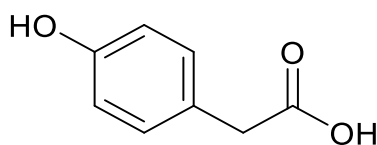
jako látka zvyšující aktivitu enzymu aldehyddehydrogenázy (ALDH), který hraje klíčovou roli při metabolismu aldehydů, zejména acetaldehydu, jakožto metabolitu ethanolu. Rovněž může přispívat k inhibici cytotoxicity vyvolané acetaldehydem. Tento ochranný účinek naznačuje potenciální využití metabolitů kvercetinu v prevenci poškození jater v souvislosti s konzumací alkoholu [70]. Projevila také nízkou antioxidační, redukční a chelatační aktivitu [72]. K dalším zjištěným účinkům lze přiřadit i vazorelaxační efekt, který vede ke snížení průměrného systolického a diastolického krevního tlaku [73].



Obrázek 17: 3-hydroxyfenyloctová kyselina.

3.6.4 4-hydroxyfenyloctová kyselina

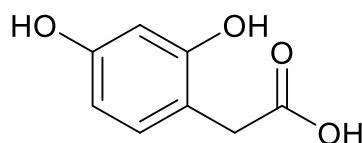
4-hydroxyfenyloctová kyselina se z hlediska chemické struktury od předchozích monokarboxylových kyselin liší pozicí hydroxy skupiny, která substituuje uhlík číslo 4 (*Obrázek 18*) [65]. Představuje střevní metabolit kempferolu [62]. Kyselina 4-hydroxyfenyloctová byla detekována v lidské plazmě a v moči po konzumaci brusinkového džusu [74]. Prostřednictvím up-regulace exprese transkripčního faktoru (jaderného faktoru souvisejícího s erytroidním faktorem 2 (Nrf2)) snižuje intracelulární hladiny ROS, a tím je tlumena aktivace zánětlivých procesů spojených s drahami MAPK (mitogenem aktivovaná proteinkináza) a NF- κ B (jaderný faktor kappa B). V konečném důsledku dochází k inhibici tvorby buněk odbourávajících kost, tzv. osteoklastů. Z tohoto hlediska by mohla být kyselina 4-hydroxyfenyloctová pravděpodobně využita k terapii osteoporózy [75]. Zaznamenan byl i možný ochranný účinek při akutním selhání ledvin navozeného sepsí [76]. Společně s kyselinou 3,4-dihydroxyfenyloctovou mohou vykazovat *in vivo* anxiolytické účinky [77]. Kromě toho kyselina 4-hydroxyfenyloctová vykazuje možný ochranný účinek proti poškození jater vyvolanému paracetamolem. Tohoto efektu dosahuje down-regulací exprese CYP2E1, enzymu, který při předávkování přeměňuje paracetamol na toxický metabolit, a zvýšením exprese a aktivity antioxidačních enzymů [78].



Obrázek 18: 4-hydroxyfenyloctová kyselina.

3.6.5 2,4-dihydroxyfenyloctová kyselina

Jedná se o chemickou sloučeninu s molekulárním vzorcem $C_8H_8O_4$ (Obrázek 19) [65]. Kyselina 2,4-dihydroxyfenyloctová byla izolována například z methanolového extraktu semen *Ilex aquifolium* [79]. Methylester kyseliny 2,4-dihydroxyfenyloctové představuje rovněž jednu z izolovaných potenciálně slabě antibakteriálně působících sloučenin methanolového extraktu podzemních částí *Aquilegia fragrans*, který se v Indii tradičně využívá k léčbě ran, zánětlivých onemocnění a veterinárních onemocnění, a to například mastitidě skotu [80].

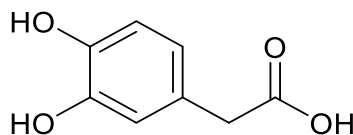


Obrázek 19: 2,4-dihydroxyfenyloctová kyselina.

3.6.6 3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina

Z chemického hlediska se jedná o dihydroxyfenyloctovou kyselinu, u níž jsou hydroxylové substituenty umístěné v polohách C3 a C4 (Obrázek 20) [65]. Stejně jako kyselina 3-hydroxyfenyloctová představuje střešní metabolit flavonoidů extraktu *Ginkgo biloba* identifikovaných v moči potkanů [69]. V lidské plazmě byla identifikována po konzumaci bobulovin (borůvek, brusinek, černého rybízu, arónie) [71]. Stejně tak po konzumaci brusinkového džusu [74]. Rovněž tvoří metabolit kvercetin a je pravděpodobně vysoce účinná jako induktor enzymů metabolismu léčiv, vychytávač volných radikálů a inhibitor peroxidem vodíku navozené cytotoxicity [70, 81]. Je považována i za hlavní metabolit dopaminu, jehož oxidací působením monoaminoxidázy (MAO) nejprve vzniká 3,4-dihydroxyfenylacetaldehyd, ze kterého

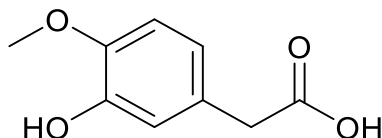
se působením ALDH tvoří právě kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová [82]. Vykazuje účinek chránící játra před poškozením vyvolaným paracetamolem, obdobně jako kyselina 4-hydroxyfenyloctová [81].



Obrázek 20: 3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina.

3.6.7 3-hydroxy-4-methoxyfenyloctová kyselina

3-hydroxy-4-methoxyfenyloctová kyselina, neboli isohomovanilová kyselina je 4-*O*-methyletherem kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové (Obrázek 21) [65]. Kyselina 3-hydroxy-4-methoxyfenyloctová byla společně s kyselinou fenyloctovou, 3-hydroxyfenyloctovou, 3,4-dihydroxyfenyloctovou, 4-hydroxy-3-methoxyfenyloctovou identifikována v ekvádorských červených banánech známých jako „Red Dacca“ [83].

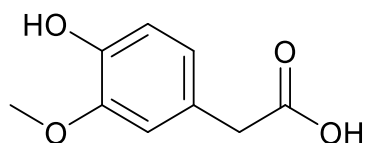


Obrázek 21: 3-hydroxy-4-methoxyfenyloctová kyselina.

3.6.8 4-hydroxy-3-methoxyfenyloctová kyselina/homovanilová kyselina

4-hydroxy-3-methoxyfenyloctová kyselina, neboli homovanilová kyselina se od předchozí sloučeniny liší polohou methoxy skupiny, která substituuje uhlík číslo 3. Jedná se tedy o 3-*O*-methylether kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové (Obrázek 22) [65]. Obdobně jako některé předešlé sloučeniny byla detekována v moči potkanů po perorálním podání extraktu *Ginkgo biloba* [69]. Stejně tak představuje metabolit flavonolu kvercetinu a jeho glykosidů, mající antioxidační aktivitu [72]. Ze stravy lze kyselinu homovanilovou přijímat bobulovinami (borůvky, brusinky, černý rybíz, arónie), po jejichž konzumaci byla detekována v lidské plazmě, obdobně jako kyselina 3-hydroxyfenyloctová a kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová [71]. V lidské plazmě

a v moči byla identifikována i po konzumaci brusinkového džusu [74]. V organismu vzniká metabolickou přeměnou vlivem COMT z kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové, která tvoří jeden z hlavních metabolitů dopaminu, jak bylo dříve uvedeno. COMT zprostředkovává přenos methylové skupiny na hydroxylovou skupinu 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny za tvorby kyseliny homovanilové. Alternativně COMT katalyzuje přeměnu přímo dopaminu na 3-methoxytyramin, který je posléze metabolizován MAO a ALDH na kyselinu homovanilovou [84].



Obrázek 22: 4-hydroxy-3-methoxyfenyloctová kyselina/homovanilová kyselina.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Chemikálie

- Chlorid železitý (FeCl_3) (Sigma-Aldrich, Německo)

Testované látky

- Kyselina fenylactová (Sigma-Aldrich, Německo)
- Kyselina 2-hydroxyfenylactová (Sigma-Aldrich, Německo)
- Kyselina 3-hydroxyfenylactová (Toronto Research Chemicals, Kanada)
- Kyselina 4-hydroxyfenylactová (Sigma-Aldrich, Německo)
- Kyselina 2,4-dihydroxyfenylactová (Biosynth, Slovensko)
- Kyselina 3,4-dihydroxyfenylactová (Extrasynthese, Francie)
- Kyselina 3-hydroxy-4-methoxyfenylactová (Sigma-Aldrich, Německo)
- Kyselina 4-hydroxy-3-methoxyfenylactová/kyselina homovanilová (Sigma-Aldrich, Německo)

Další používané chemikálie

- Disodná sůl ethylendiamintetraoctové kyseliny (Na_2EDTA) (Sigma-Aldrich, Německo)
- Kyselina chlorovodíková (HCl , 35 %) (Penta, ČR)
- Kyselina fosforečná (H_3PO_4 , 85 %) (Sigma-Aldrich, Německo)
- Kyselina salicylová (Sigma-Aldrich, Německo)
- Katechol (Sigma-Aldrich, Německo)
- 2,3-dihydroxybenzoová kyselina (2,3DHBK) (Sigma-Aldrich, Německo)
- 2,5-dihydroxybenzoová kyselina (2,5DHBK) (Sigma-Aldrich, Německo)
- Peroxid vodíku (H_2O_2 , 30 %) (Sigma-Aldrich, Německo)
- Triethylamin (Sigma-Aldrich, Německo)

Chemikálie pro přípravu pufrů

- Kyselina octová (CH_3COOH) (Penta, ČR)
- Octan sodný bezvodý (CH_3COONa) (Penta, ČR)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) (Sigma-Aldrich, Německo)

Rozpouštědla

- Acetonitril CHROMASOLV, HPLC gradient grade, ≥99,9 % (Honeywell, Indiana USA)
- Methanol CHROMASOLV, HPLC gradient grade, ≥99,9 % (Fisher Chemical, UK)
- Ultračistá voda připravená pomocí přístroje Milli-Q RG (Merck Millipore, Massachusetts, USA)

4.2 Materiál

- Automatické jednobáňové pipety o různém objemu (Brand, Německo)
- Centrifugační zkumavky 15 ml, 50 ml (Brand, Německo)
- Mikrostříkačka 50 µl (Hamilton Company, Nevada, USA)
- Mikrozukavky 1,5 ml (Eppendorf, Německo)
- Špičky k pipetám o různém objemu (Eppendorf, Německo)

4.3 Přístrojové vybavení

- Analytické váhy Kern ALT 220-4NM (Kern & Sohn GmbH, Německo)
- Coulometrický detektor Coulochem III (ESA, Massachusetts, USA)
- Laboratorní ultrazvuková vana (BANDELIN Electronic GmbH, Německo)
- Monolitická HPLC kolona Onyx C8 - 100 x 4,6 mm (Phenomenex, Kalifornie, USA)
- pH-metr WTW pH 538 (Xylem Česká republika spol. s r.o., Praha)
- Pumpa ESA model 582 (ESA, Massachusetts, USA)
- Vortex mixér IKA® Vortex Genius 3 (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Německo)

4.4 Využívané programy

- Ke zpracování chromatografických dat byl použit chromatografický software DataApex Clarity verze 9.0 (DataApex, ČR).
- Grafické a statistické zpracování výsledků bylo provedeno za použití programu GraphPad Prism verze 10.1.1 pro Windows (GraphPad Software, Massachusetts, USA).

4.5 Příprava zásobních roztoků a roztoků využívaných během experimentu

- **Roztok železitých iontů Fe^{3+} (1 mM)**

Příprava vodného roztoku Fe^{3+} (1mM) byla provedena rozpuštěním příslušného množství FeCl_3 v ultračisté vodě.

- **Roztok kyseliny salicylové (66,67 Mm)**

Příprava roztoku kyseliny salicylové byla provedena rozpuštěním příslušného množství kyseliny salicylové v potřebném množství methanolu.

- **Pufr pH 4,5**

Příprava pufru o pH 4,5 byla provedena smícháním vodného roztoku 27,3 mM kyseliny octové a vodného roztoku 15 mM octanu sodného.

- **Pufr pH 7,5**

Příprava pufru o pH 7,5 byla provedena smícháním potřebného množství TRIS v ultračisté vodě za vzniku 5 mM TRIS.

- **Roztoky testovaných látek – fenylactových kyselin**

Příprava methanolických 5 mM roztoků testovaných látek byla provedena rozpuštěním příslušného množství dané látky v potřebném množství methanolu.

Takto připravené 5 mM zásobní roztoky byly pro měření vždy naředěné na koncentrace využívané v experimentu (5 mM, 2,5 mM, 250 μM , 125 μM , 12,5 μM , 2,5 μM a 1,25 μM) potřebným množstvím methanolu.

- **Roztoky standardů, tedy roztoky katecholu a 2,3DHBK a 2,5DHBK**

Příprava 10 mM roztoků standardů byla provedena rozpuštěním příslušného množství katecholu/2,3DHBK/2,5DHBK v potřebném množství vody. Následně bylo provedeno jejich naředění a smíchání 27 μl 10 μM katecholu, 130 μl 1 μM 2,3DHBK a 130 μl 1 μM 2,5DHBK a 713 μl ultračisté vody.

- **Kontrolní vzorky**

Kontrolní vzorky byly vždy připraveny smícháním 700 μl pufru o pH 4,5 nebo 7,5, 200 μl methanolu, 50 μl 1 mM Fe^{3+} , 45 μl 66,67 mM kyseliny salicylové a 5 μl 30 % H_2O_2 .

- **Testované vzorky**

Testované vzorky byly vždy připraveny smícháním 700 μl pufru o pH 4,5 nebo 7,5, 200 μl testované látky o příslušné koncentraci, 50 μl 1 mM Fe^{3+} , 45 μl 66,67 mM kyseliny salicylové a 5 μl 30 % H_2O_2 .

4.6 Příprava mobilní fáze (pufr/ACN 93/7 v/v o objemu 200 ml)

Příprava 5 mM H_3PO_4 pufru byla provedena v kádince smícháním 68 μl kyseliny fosforečné a 199,932 ml ultračisté vody. Posléze bylo odebráno 10 ml pufru a přidáno 10 ml 20 mM EDTA. Za využití triethylaminu bylo nastaveno pH 2,85 a výsledný roztok byl přefiltrován aparaturou na vakuovou filtraci.

Ve 200 ml odměrné baňce bylo smícháno 14 ml acetonitrilu a 186 ml připraveného pufru.

Výsledná mobilní fáze byla vložena na 5 minut do ultrazvukové lázně.

4.7 Průběh experimentu

- HPLC přístroj byl nastaven v isokratickém režimu s průtokovou rychlostí 1,0 ml/min.
- Nejprve byl připraven 1 mM vodný roztok FeCl_3 .
- Rovněž byly připraveny roztoky testovaných látek – octových kyselin o koncentraci 5 mM, 2,5 mM, 250 μM , 125 μM , 12,5 μM , 2,5 μM a 1,25 μM , a to naředěním příslušných 5 mM zásobních roztoků testovaných látek methanolem.
- V mikrozkuhavce byla připravena směs standardů ve vodě, a to smícháním 27 μl 10 μM katecholu, 130 μl 1 μM 2,5 DHBK a 130 μl 1 μM 2,3DHBK a 713 μl ultračisté vody.
- 20 μl této směsi bylo pomocí Hamiltonovy mikrostříkačky aplikováno do HPLC. Po proběhlé analýze byly změřeny plochy vzniklých píků standardů.
- Příprava směsi standardů a jejich analýza byla opakována třikrát a získané výsledné hodnoty ploch byly zprůměrovány.

- Následně byl v mikroskopu připraven kontrolní vzorek, a to smícháním 700 μl pufru o pH 4,5 nebo 7,5, 200 μl methanolu, 50 μl 1mM Fe^{3+} , 45 μl 66,67 mM kyseliny salicylové a 5 μl 30 % H_2O_2 .
- Přidáním H_2O_2 začala probíhat Fentonova reakce. Za stálého míchání probíhala po dobu 3 minut.
- Po 3 minutách bylo 20 μl kontrolního vzorku pomocí Hamiltonovy mikrostříkačky aplikováno do HPLC. Po proběhlé analýze byly změřeny plochy vzniklých píků analytů odpovídající katecholu, 2,3DHBK a 2,5DHBK.
- Příprava kontrolního vzorku a jeho analýza byla opakována čtyřikrát a výsledné hodnoty ploch byly zprůměrovány.
- Posléze byl v mikroskopu připraven testovací vzorek, a to smícháním 700 μl pufru o pH 4,5 nebo 7,5, 200 μl testované látky příslušné koncentrace, 50 μl 1 mM Fe^{3+} , 45 μl 66,67 mM kyseliny salicylové a 5 μl 30 % H_2O_2
- Přidáním H_2O_2 začala opět probíhat Fentonova reakce. Za stálého míchání probíhala po dobu 3 minut.
- Po 3 minutách bylo 20 μl testovaného vzorku pomocí Hamiltonovy mikrostříkačky aplikováno do HPLC. Po proběhlé analýze byly změřeny plochy vzniklých píků analytů.
- Příprava testovaného vzorku a jeho analýza byla opakována třikrát vždy pro každou koncentraci testované sloučeniny a výsledné hodnoty ploch byly zprůměrovány.
- Ze získaných hodnot ploch píků pro jednotlivé testované látky byly vytvořeny grafy, prostřednictvím nichž byly určeny antioxidační, neutrální či pro-oxidační vlastnosti testovaných sloučenin.

4.8 Matematické a statistické vyhodnocení

Procento snížení (tedy antioxidační účinek) anebo zvýšení (tedy pro-oxidační účinek) produkce hydroxylových radikálů bylo vypočítáno ze součtu koncentrací katecholu, 2,3DHBK a 2,5DHBK mezi testovaným a kontrolním vzorkem, který obsahoval namísto testované sloučeniny rozpouštědlo.

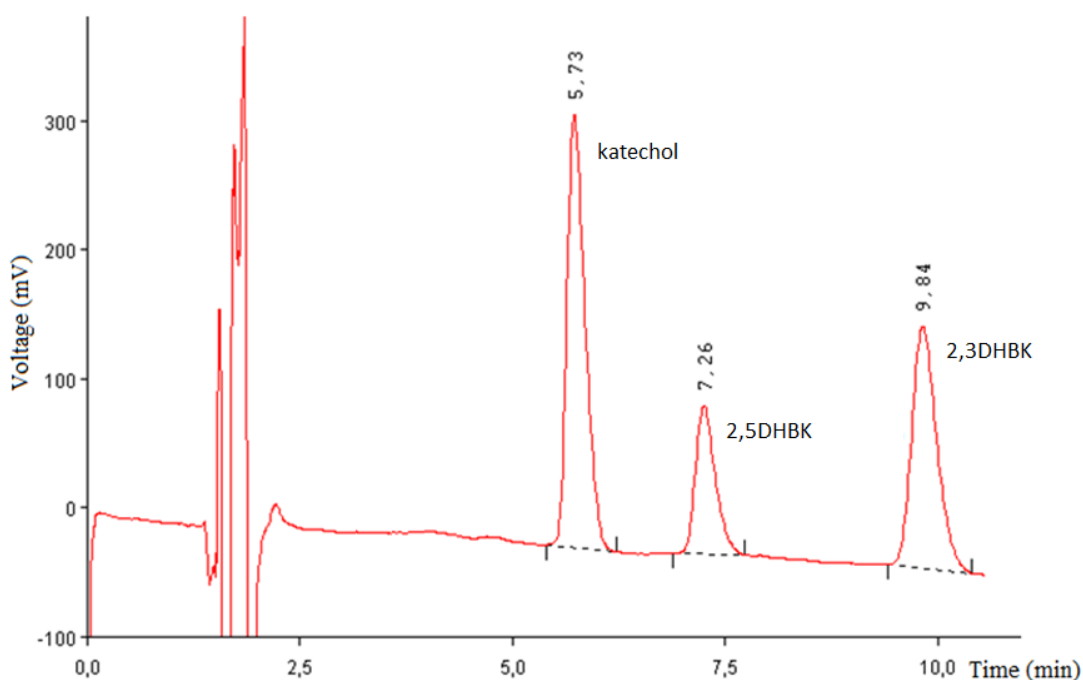
Naměřené výsledky jsou představovány jako průměr \pm směrodatná odchylka, která byla vypočítána podle vzorce $\sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1}}$. Statistické porovnání produkce hydroxylových radikálů bylo realizováno použitím testu ANOVA následovaného Dunnettových post-hoc testem.

5 VÝSLEDKY

Z naměřených hodnot HPLC analýzy vzorků byly vytvořeny grafy, které zobrazují vliv testovaných fenylactových kyselin na produkci hydroxylových radikálů během železem katalyzované Fentonovy reakce při pH 7,5 a pH 4,5, tedy při pH blízké fyziologickému pH a pH simulující kyselé prostředí lysozomů našeho organismu, rovněž tak kyselé prostředí žaludku a duodena.

Výsledné grafy znázorňují procentuální změny produkce hydroxylových radikálů ve srovnání s kontrolními vzorky. Hodnoty na ose X znázorňují koncentrační poměry dané testované látky a železitých iontů. Hodnoty na ose Y zobrazují produkci hydroxylových radikálů v procentech a posun produkce vlivem testovaných fenylactových kyselin. Změny na ose Y směrem k záporným hodnotám vyjadřují snížení produkce hydroxylových radikálů, respektive antioxidační účinek dané testované látky. Naopak změny směrem ke kladným hodnotám značí zvýšení produkce hydroxylových radikálů, jinými slovy pro-oxidační účinek testované sloučeniny.

„Obrázek 23“ zobrazuje chromatogram HPLC analýzy standardů katecholu, 2,5-dihydroxybenzoové kyseliny (2,5DHBK) a 2,3-dihydroxybenzoové kyseliny (2,3DHBK).



Obrázek 23: Chromatogram HPLC analýzy standardů.

Tyto sloučeniny vznikaly jako produkty reakce kyseliny salicylové a hydroxylových radikálů v testovaných vzorcích. Během měření byly katechol, 2,5DHBK a 2,3DHBK ve vzorcích detekovány, kvantifikovány a použity k určení antioxidačních/neutrálních/pro-oxidačních vlastností testovaných fenylactových kyselin.

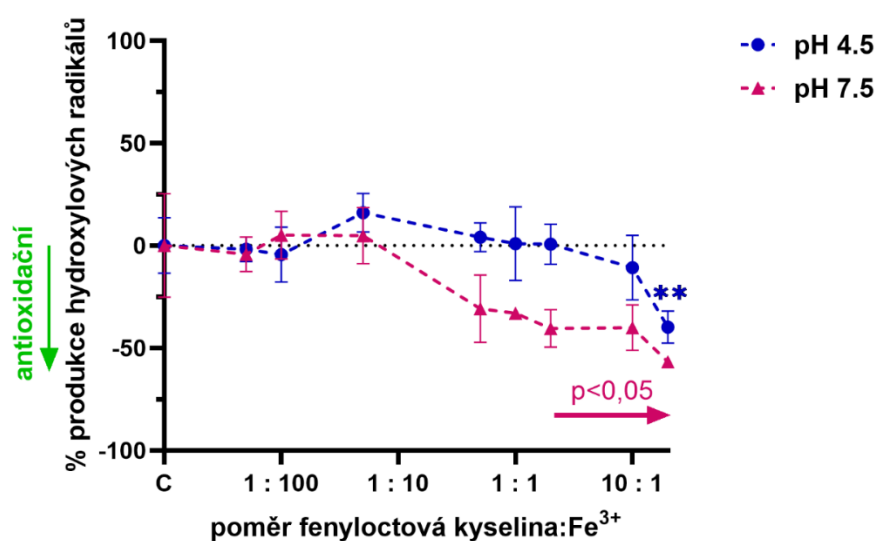
5.1 Vliv testovaných fenylactových kyselin na železem katalyzovanou Fentonovu reakci

Všechny testované vzorky příslušných fenylactových kyselin byly porovnávány s kontrolním vzorkem (C). Ten se od testovaných vzorků lišil přítomností methanolu namísto testované látky.

Finální koncentrace železitých iontů (Fe^{3+}) ve vzorku byla vždy $50 \mu\text{M}$.

5.1.1 Vliv kyseliny fenylactové

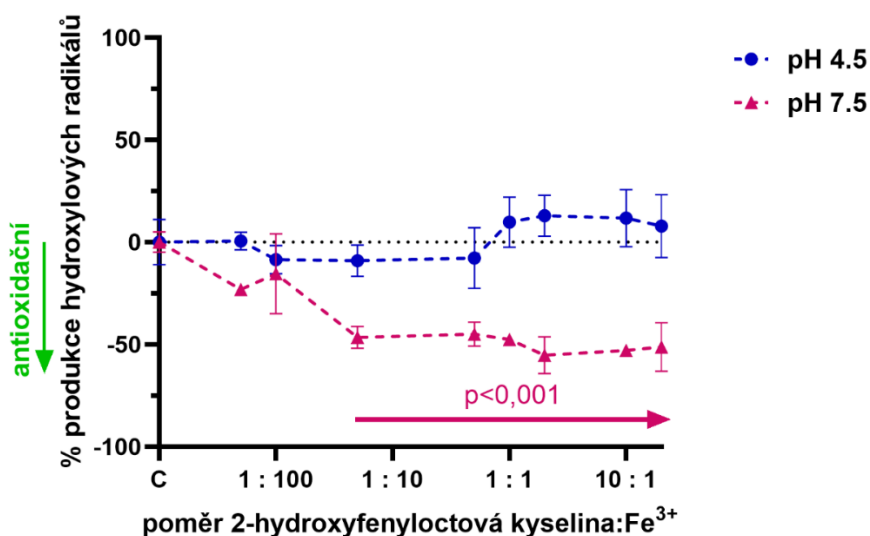
Kyselina fenylactová vykázala významný pokles produkce hydroxylových radikálů při pH 7,5 i pH 4,5, jinými slovy vykázala antioxidační účinek. Při pH 4,5 se však antioxidační aktivita projevila až při nejvyšší koncentraci testované látky.



Obrázek 24: Grafické zobrazení vlivu kyseliny fenylactové na železem katalyzovanou Fentonovu reakci při pH 7,5 a pH 4,5.

5.1.2 Vliv kyseliny 2-hydroxyfenoctové

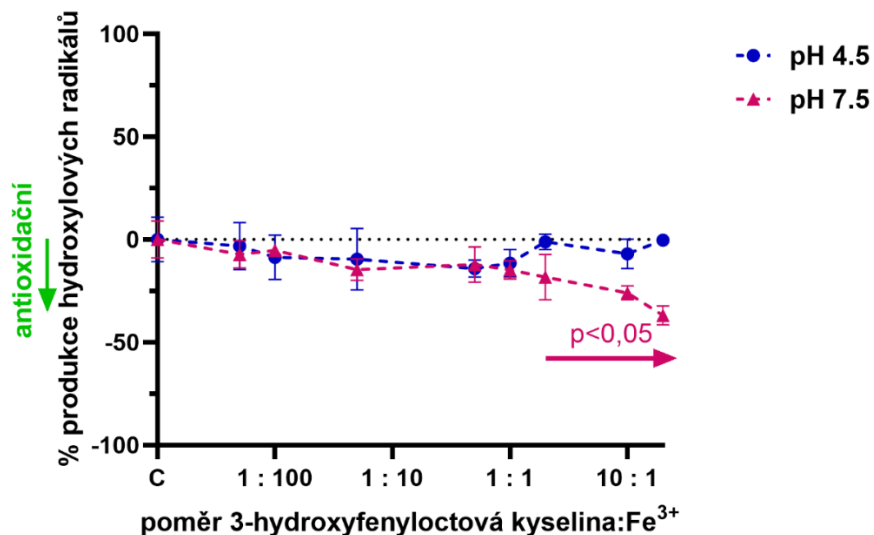
U kyseliny 2-hydroxyfenoctové byl při pH 7,5 rovněž pozorován významný pokles produkce hydroxylových radikálů od koncentračního poměru 1:20 (2-hydroxyfenoctová kyselina:Fe³⁺), což značí její antioxidační aktivitu. Při pH 4,5 ke změně v produkci hydroxylových radikálů nedošlo, z čehož vyplývá její neutrální chování v tomto prostředí.



Obrázek 25: Grafické zobrazení vlivu kyseliny 2-hydroxyfenoctové na železem katalyzovanou Fentonovu reakci při pH 7,5 a pH 4,5.

5.1.3 Vliv kyseliny 3-hydroxyfenoctové

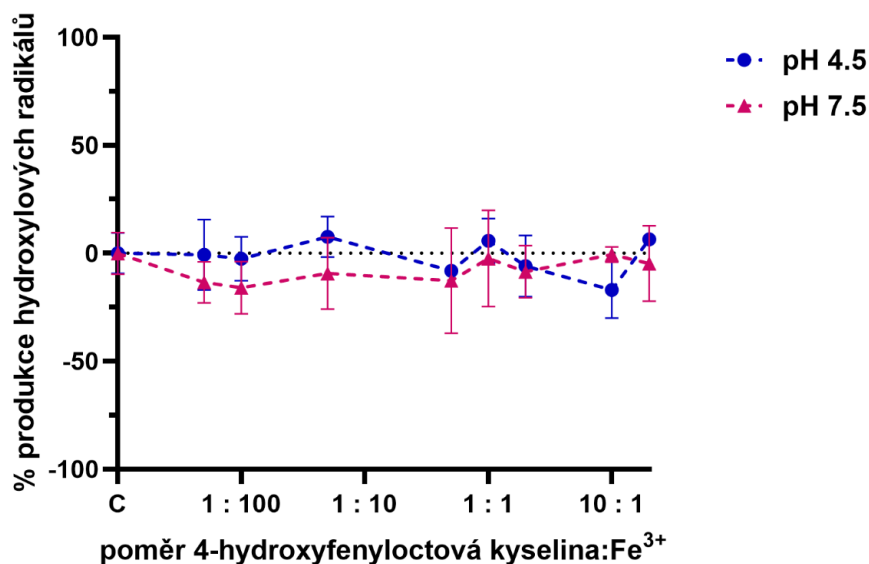
Z „Obrázek 26“ lze vyvodit antioxidační vlastnosti testované látky, kyseliny 3-hydroxyfenoctové, při pH 7,5 od koncentračního poměru 2:1 (3-hydroxyfenoctová kyselina:Fe³⁺). Naproti tomu při pH 4,5 bylo pozorováno neutrální působení na produkci hydroxylových radikálů během železem katalyzované Fentonovy reakce.



Obrázek 26: Grafické zobrazení vlivu kyseliny 3-hydroxyfenyloctové na železem katalyzovanou Fentonovu reakci při pH 7,5 a pH 4,5.

5.1.4 Vliv kyseliny 4-hydroxyfenyloctové

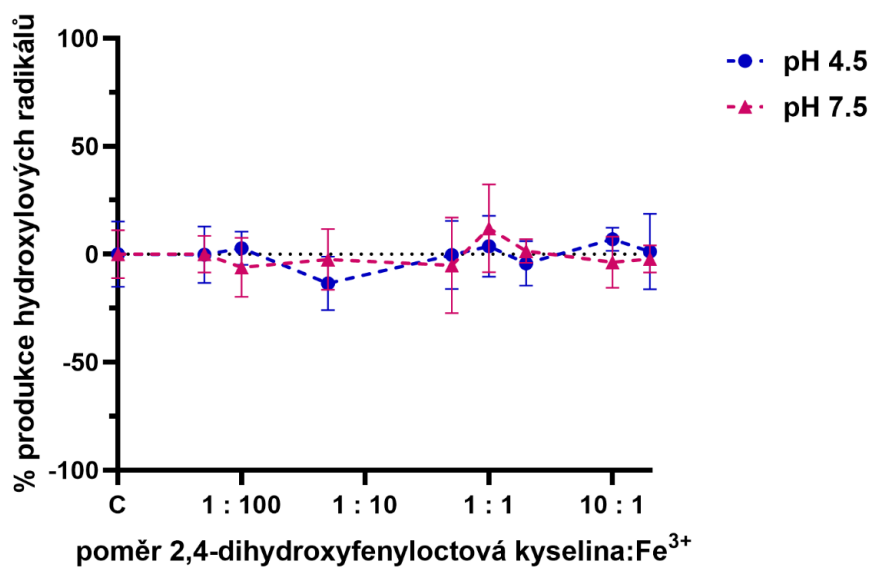
Kyselina 4-hydroxyfenyloctová neprokázala významný posun v produkci hydroxylových radikálů v žádném testovaném prostředí. Její vliv na tvorbu hydroxylových radikálů během železem katalyzované Fentonovy reakce byl neutrální.



Obrázek 27: Grafické zobrazení vlivu kyseliny 4-hydroxyfenyloctové na železem katalyzovanou Fentonovu reakci při pH 7,5 a pH 4,5.

5.1.5 Vliv kyseliny 2,4-dihydroxyfenoctové

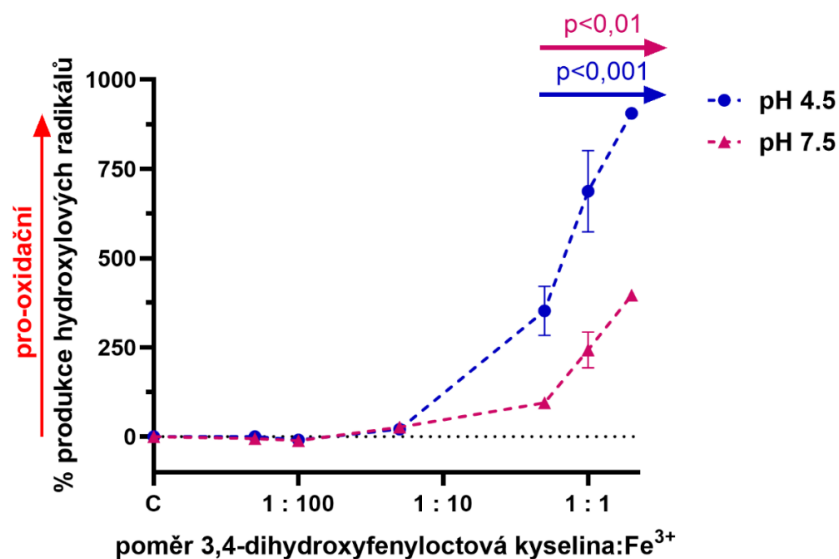
Ani kyselina 2,4-dihydroxyfenoctová neměla významný vliv na produkci hydroxylových radikálů. Při obou hodnotách pH prostředí působila neutrálně.



Obrázek 28: Grafické zobrazení vlivu kyseliny 2,4-dihydroxyfenoctové kyseliny na železem katalyzovanou Fentonovu reakci při pH 7,5 a pH 4,5.

5.1.6 Vliv kyseliny 3,4-dihydroxyfenoctové

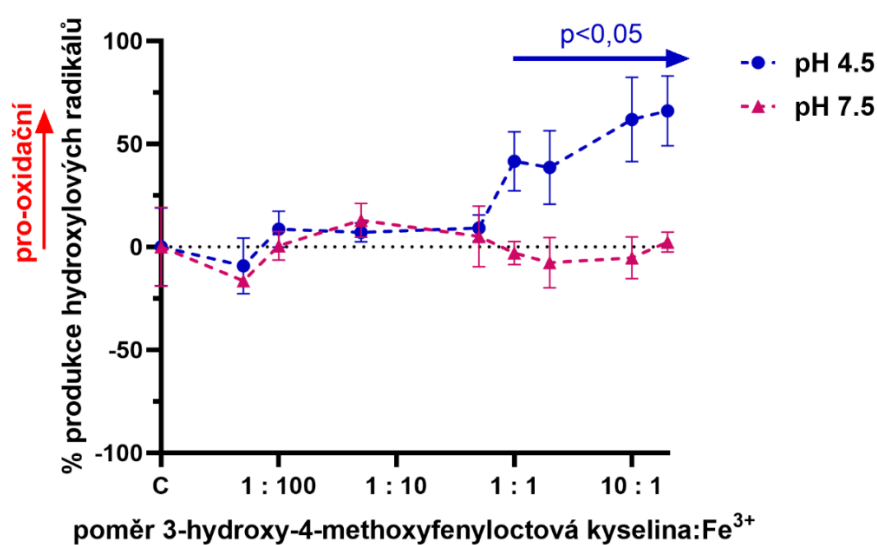
Kyselina 3,4-dihydroxyfenoctová prokázala velmi silně významný nárůst produkce hydroxylových radikálů od koncentračního poměru 1:2 (3,4-dihydroxyfenoctová kyselina:Fe³⁺). Z grafu je patrná výrazná pro-oxidační aktivita v obou prostředích pH.



Obrázek 29: Grafické zobrazení vlivu kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové na železem katalyzovanou Fentonovu reakci při pH 7,5 a pH 4,5.

5.1.7 Vliv kyseliny 3-hydroxy-4-methoxyfenyloctové

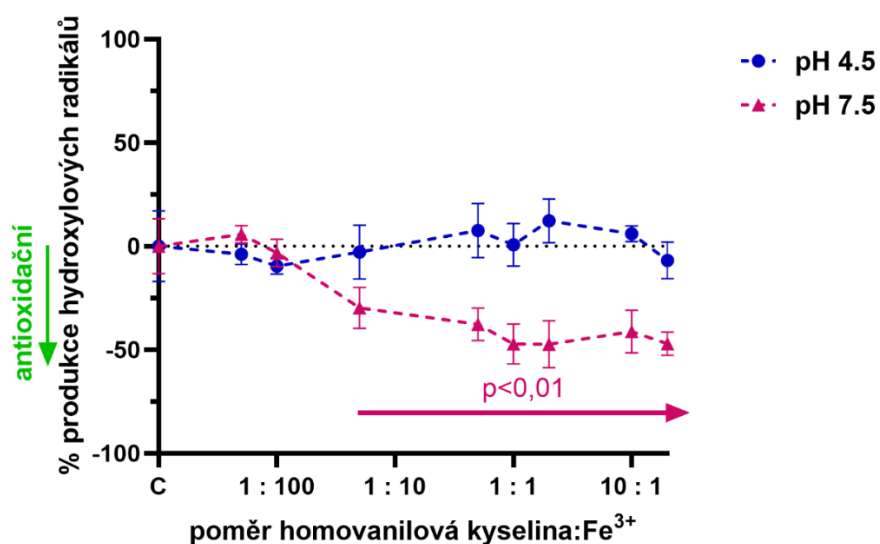
U kyseliny 3-hydroxy-4-methoxyfenyloctové je patrná značná pro-oxidační aktivita v prostředí pH 4,5, která se projevuje od koncentračního poměru 1:1 (3-hydroxy-4-methoxyfenyloctová kyselina:Fe³⁺). Při pH 7,5 změna v produkci radikálů prokázána nebyla, z čehož vyplývá její neutrální vliv.



Obrázek 30: Grafické zobrazení vlivu kyseliny 3-hydroxy-4-methoxyfenyloctové na železem katalyzovanou Fentonovu reakci při pH 7,5 a pH 4,5.

5.1.8 Vliv kyseliny 4-hydroxy-3-methoxyfenyloctové/kyseliny homovanilové

Z „Obrázek 31“ vyplývá podstatná antioxidační aktivita kyseliny 4-hydroxy-3-methoxyfenyloctové, respektive homovanilové, v prostředí o pH 7,5, již od koncentračního poměru 1:2 (kyselina homovanilová:Fe³⁺). Přičemž antioxidační působení se zvyšovalo s rostoucí koncentrací kyseliny. Při pH 4,5 vliv kyseliny na nárůst ani pokles produkce hydroxylových radikálů zaznamenán nebyl. V tomto prostředí vykazala látka neutrální vliv.



Obrázek 31: Grafické zobrazení vlivu kyseliny homovanilové na železem katalyzovanou Fentonovu reakci při pH 7,5 a pH 4,5.

6 DISKUSE

Flavonoidy představují sekundární rostlinné metabolity polyfenolické struktury. Jejich příjem skrze potraviny a nápoje rostlinného původu je spojen se širokou škálou zdravotních benefitů. V lidském těle vykazují například antioxidační, protizánětlivé, protirakovinné, kardioprotektivní nebo neuroprotektivní účinky [34]. Biologická aktivita flavonoidů se stala předmětem mnoha *in vitro* a *in vivo* studií, přičemž největší zájem je zpravidla věnován jejich antioxidačním vlastnostem [57]. Antioxidační působení flavonoidů vychází z jejich schopnosti přímo vychytávat či zamezovat tvorbě volných radikálů, chelatovat ionty přechodných kovů anebo modulovat antioxidační odpověď organismu [42]. Za určitých okolností však mohou vystupovat i jako pro-oxidanty a zprostředkovávat propagaci Fentonovy reakce katalyzované železem za tvorby vysoce reaktivních hydroxylových radikálů [55].

Potravou přijímané flavonoidy podléhají před vstřebáním v tenkém a tlustém střevě rozsáhlému metabolismu, a jsou tak transformovány na snadněji vstřebatelné flavonoidní aglykony a další kolonické katabolické produkty, včetně jednoduchých fenolických sloučenin, mezi které lze řadit i fenylactové kyseliny, které byly předmětem výzkumu této práce [59]. Právě tyto malé fenolické metabolity by mohly být zodpovědné za *in vivo* pozitivní účinky perorálně přijímaných flavonoidů.

Antioxidační a pro-oxidační aktivita byla stanovována u osmi vybraných fenylactových kyselin: kyseliny fenylactové, 2-, 3-, 4-hydroxyfenylactové, 2,4- a 3,4-dihydroxyfenylactové, 3-hydroxy-4-methoxyfenylactové a homovanilové.

Pro posouzení uváděných účinků byl využíván *in vitro* Fentonův systém, v rámci kterého byla hodnocena inhibice nebo indukce tvorby hydroxylových radikálů, a to detekcí a kvantifikací aromatických hydroxylovaných derivátů kyseliny salicylové, tedy katecholu, 2,3DHBK a 2,5DHBK. Tyto analyty vznikaly jako produkty reakce kyseliny salicylové a hydroxylových radikálů a pro jejich stanovení byla využívána HPLC metoda spojená s coulometrickou detekcí [29].

Antioxidační vlastnosti byly zjištěny u čtyř námi testovaných látek, přesněji u kyseliny fenylactové, 2-hydroxyfenylactové, 3-hydroxyfenylactové a homovanilové. Kyselina fenylactová prokázala snížení produkce hydroxylových radikálů během železem katalyzované Fentonovy reakce v rámci obou testovaných

pato/fyziologických podmínek pH 4,5 a 7,5. Při pH 4,5 se však antioxidační aktivita projevila až při vysokých koncentracích kyseliny. Ostatní zmiňované látky, tedy 2-hydroxyfenyloctová, 3-hydroxyfenyloctová a homovanilová kyselina vykazaly antioxidační vlastnosti pouze v prostředí o pH 7,5 a v prostředí o pH 4,5 působily neutrálně. Neutrální působení v obou pato/fyziologických prostředích pH bylo zaznamenáno u kyseliny 4-hydroxyfenyloctové a 2,4-dihydroxyfenyloctové. Pro-oxidační aktivitu vykazovala kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová a 3-hydroxy-4-methoxyfenyloctová. Zatímco kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová vykazovala pro-oxidační vlastnosti v obou prostředích pH, kyselina 3-hydroxy-4-methoxyfenyloctová pouze v prostředí o pH 4,5 a v prostředí o pH 7,5 působila neutrálně.

Ačkoliv nebyla na základě teoretických poznatků o vztazích mezi strukturou a účinkem očekávána u kyseliny fenylloctové antioxidační aktivita, studie od Wang *et al.* (2023) došla k opačnému závěru – tuto aktivitu prokázala, stejně jako námi provedený experiment. V této studii byla antioxidační aktivita kyseliny fenylloctové testována metodou vychytávání stabilního volného radikálu DPPH• (2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazyl), a to nejprve pomocí TLC-bioautografického testu a následně spektrofotometrického DPPH• testu podle metody Brand-Williamsové [85]. Zároveň nelze očekávat, že by mechanismus antioxidačního působení této sloučeniny probíhal na základě chelatace kovů, a tak je pravděpodobné, že se jedná o přímé vychytávání ROS.

Rovněž kyselina 2-hydroxyfenyloctová v naší práci vykazala antioxidační účinky. Ke stejnému závěru dospěla i studie od Samsonowicz *et al.* (2021), v rámci které byla studována antioxidační aktivita kyseliny 2-hydroxyfenyloctové a jejích solí s alkalickými kovy metodou založenou na zhášení radikálu ABTS⁺• (2,2'-azino-bis(3-ethyl-2,3-dihydrobezothiazol-6-sulfonátu)) a metodami FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) a CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity), které pracují na principu redoxní reakce [86]. Působení této fenylloctové kyseliny lze pravděpodobně přisuzovat přítomnosti hydroxylové skupiny v *ortho* poloze, která umožňuje tvorbu intramolekulární vodíkové vazby s karboxylovou funkcí a stabilizaci vznikajícího fenoxylového radikálu.

Antioxidační aktivita byla zaznamenána rovněž u kyseliny 3-hydroxyfenyloctové a kyseliny homovanilové, což je v souladu se závěry studie Chen *et al.* (2020). Tato studie se zaměřila na hodnocení antioxidačního potenciálu 18 fenolických kyselin (včetně 6 fenyloctových), a to za využití DPPH• a FRAP metod. Antioxidační vlastnosti v rámci této studie byly dále zaznamenány i u kyseliny 4-hydroxyfenyloctové, 3,4-dihydroxyfenyloctové a 3-hydroxy-4-methoxyfenyloctové [87]. V našem experimentu byly nicméně u uvedených kyselin zjištěny rozdílné výsledky: kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová a 3-hydroxy-4-methoxyfenyloctová působily pro-oxidačně, kyselina 4-hydroxyfenyloctová vykazovala neutrální chování.

O pro-oxidační aktivitě kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové pojednává studie Tang *et al.* (2016) a uvádí, že tato kyselina může vykazovat jak antioxidační, tak pro-oxidační aktivitu, a to v závislosti na použité koncentraci a podmínkách prostředí, ve kterém je testována [88]. Pro-oxidační aktivita kyseliny 3-hydroxy-4-methoxyfenyloctové může být pravděpodobně přisuzována methoxylové skupině v poloze 4, která v pro-oxidačních podmínkách, jako je Fentonův systém, může snižovat schopnost sloučeniny efektivně chelatovat ionty železa. Nedostatečná chelatace vede k vyšší dostupnosti volného železa a následně k tvorbě hydroxylových radikálů prostřednictvím Fentonovy reakce.

Neutrální chování kyseliny 4-hydroxyfenyloctové a 2,4-dihydroxyfenyloctové ve Fentonově systému lze pravděpodobně vysvětlit jejich omezeným redoxním potenciálem a nedostatečnou chelatační schopností vůči železu, což ve výsledku nevede ani k inhibici, ani k indukci produkce hydroxylových radikálů během Fentonovy reakce. Studie Chen *et al.* (2020) a Biskup *et al.* (2013) však u kyseliny 4-hydroxyfenyloctové identifikovaly antioxidační aktivitu metodou DPPH• a FRAP, což může souviset s rozdílnými experimentálními podmínkami [87, 89]. Zároveň je také nutné vzít v potaz, že použití stabilních syntetických radikálů jako jsou DPPH• a ABTS•⁺ má jen nízkou biologicky vypovídající hodnotu a tyto metody mohou odhalit jen antioxidační, ale ne pro-oxidační působení testovaných látek.

Závěrem lze shrnout, že výsledky této diplomové práce prokazují úzký vztah mezi účinky fenyloctových kyselin a jejich chemickou strukturou – počtem a polohou navázaných substituentů. Zavedení jedné hydroxylové skupiny do struktury kyseliny fenyloctové modifikuje její antioxidační vlastnosti, a to v závislosti na její poloze.

Kyselina 2-hydroxyfenyloctová vykazuje výraznou antioxidační aktivitu, zatímco 3-hydroxyfenyloctová ji vykazuje pouze slabě a kyselina 4-hydroxyfenyloctová ji neprojevuje vůbec. Přidání druhé hydroxylové skupiny může účinek oslabit, jako v případě kyseliny 2,4-dihydroxyfenyloctové, nebo dokonce zcela zvrátit, jako v případě kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové. U izomerů s jednou hydroxylovou a jednou methoxy skupinou má kyselina 3-hydroxy-4-methoxyfenyloctová pro-oxidační charakter, zatímco kyselina homovanilová si ponechává antioxidační vlastnosti.

7 ZÁVĚR

V této diplomové práci byl stanovován vliv osmi vybraných fenyloctových kyselin, metabolitů flavonoidů, na produkci hydroxylových radikálů z železem katalyzované Fentonovy reakci ve dvou pato/fyziologických prostředí pH 4,5 a 7,5.

Výsledky měření prokázaly antioxidační aktivitu u čtyř testovaných fenyloctových kyselin. Samotná fenyloctová kyselina vykazovala antioxidační účinky při obou hodnotách pH. 2-hydroxyfenyloctová, 3-hydroxyfenyloctová a homovanilová kyselina snižovaly produkci hydroxylových radikálů pouze v neutrálním pH, zatímco při pH 4,5 vykazovaly neutrální účinek.

Výrazná pro-oxidační aktivita, a tedy zvýšená produkce hydroxylových radikálů byla zaznamenána u kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové v rámci obou pH prostředí. Pro-oxidační vlastnosti projevila rovněž kyselina 3-hydroxy-4-methoxyfenyloctová, avšak pouze v prostředí o pH 4,5, v prostředí o pH 7,5 působila neutrálně.

Zbylé dvě fenyloctové kyseliny: 4-hydroxyfenyloctová a 2,4-dihydroxyfenyloctová kyselina působily neutrálně a neprokázaly vliv na produkci hydroxylových radikálů během železem katalyzované Fentonovy reakce.

Je potřeba zmínit, že testované fenyloctové sloučeniny byly hodnoceny HPLC *in vitro* metodou. Experimentálně stanovené chování těchto látek tak nemusí plně odpovídat biologickým podmínkám *in vivo* a vyžaduje další hodnocení.

8 SEZNAM ZKRATEK

2,3DHBK	2,3-dihydroxybenzoová kyselina
2,5DHBK	2,5-dihydroxybenzoová kyselina
4CL	4-kumarát-CoA-ligáza
ABC	ATP-Binding Cassette (adenosintrifosfát-vázající transportér)
ABTS ⁺ •	2,2'-azino-bis(3-ethyl-2,3-dihydrobezothiazol-6-sulfonát)
ALDH	Aldehyddehydrogenáza
BCRP	Protein rezistence vůči rakovině prsu
C4H	Cinnamoyl-4-hydroxyláza
CAT	Kataláza
CBG	Glukocerebrosidáza
COMT	Katechol-O-methyltransferáza
CP	Gen pro ceruloplasmin
CUPRAC	Cupric Reducing Antioxidant Capacity
DCYTB	Duodenální cytochrom B reduktáza 1
DMT1	Substrát transportéru dvoumocných iontů 1
DPPH•	2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazyl
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
GPx	Glutathionperoxidáza
GRx	Glutathionreduktáza
GST	Glutathion-S-transferáza
HC	Hereditární hemochromatóza
HFE gen	Gen regulující metabolismus železa
HMOX1	Hemoxygenáza 1
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LPH	Laktáza-florizin hydroláza
MAO	Monoaminoxidáza
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase (mitogenem aktivovaná proteinkináza)
MRP	Protein multirezistence
NF-κB	Jaderný faktor kappa B

NQO	NAD(P)H-chinon oxireduktáza
Nrf2	Jaderný faktor související s erytrodním faktorem 2
PAL	Fenylalanin-amoniak-lyáza
P-gp	P-glykoprotein
RNS	Reaktivní formy dusíku
ROS	Reaktivní formy kyslíku
SGLT1	Sodno-dependentní glukózový transportér
SOD	Superoxiddismutáza
SULT	Sulfotransferáza
TF	Transferin
UGT	Uridin-5'-difosfát glukuronosyltransferáza

9 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Přehled reaktivních forem kyslíku (ROS) a reaktivních forem dusíku (RNS) [27].	22
--	----

10 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Homeostáza železa [7].	15
Obrázek 2: Chemická struktura látek chelatujících železo (deferoxamin, deferasirox, deferipron).	21
Obrázek 3: Základní chemická struktura flavonoidů, isoflavonoidů a neoflavonoidů.	25
Obrázek 4: Základní chemická struktura chalkonů.	26
Obrázek 5: Základní chemická struktura flavanonů.	27
Obrázek 6: Základní chemická struktura isoflavonů.	27
Obrázek 7: Základní chemická struktura flavonů.	28
Obrázek 8: Základní chemická struktura flavanolů.	28
Obrázek 9: Základní chemická struktura flavanolů.	29
Obrázek 10: Základní chemická struktura anthocyanů.	29
Obrázek 11: Syntéza flavonoidů [44].	31

Obrázek 12: Metabolismus flavonoidů - převzato a upraveno [37].	34
Obrázek 13: Vychytávání volných radikálů flavonoidy [58].	35
Obrázek 14: Vazebná místa pro ionty kovů [58].	36
Obrázek 15: Fenyloctová kyselina.	38
Obrázek 16: 2-hydroxyfenyloctová kyselina.	38
Obrázek 17: 3-hydroxyfenyloctová kyselina.	39
Obrázek 18: 4-hydroxyfenyloctová kyselina.	40
Obrázek 19: 2,4-dihydroxyfenyloctová kyselina.	40
Obrázek 20: 3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina.	41
Obrázek 21: 3-hydroxy-4-methoxyfenyloctová kyselina.	41
Obrázek 22: 4-hydroxy-3-methoxyfenyloctová kyselina/homovanilová kyselina.	42
Obrázek 23: Chromatogram HPLC analýzy standardů.	49
Obrázek 24: Grafické zobrazení vlivu kyseliny fenyloctové na železem katalyzovanou Fentonovu reakci při pH 7,5 a pH 4,5.	50
Obrázek 25: Grafické zobrazení vlivu kyseliny 2-hydroxyfenyloctové na železem katalyzovanou Fentonovu reakci při pH 7,5 a pH 4,5.	51
Obrázek 26: Grafické zobrazení vlivu kyseliny 3-hydroxyfenyloctové na železem katalyzovanou Fentonovu reakci při pH 7,5 a pH 4,5.	52
Obrázek 27: Grafické zobrazení vlivu kyseliny 4-hydroxyfenyloctové na železem katalyzovanou Fentonovu reakci při pH 7,5 a pH 4,5.	52
Obrázek 28: Grafické zobrazení vlivu kyseliny 2,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny na železem katalyzovanou Fentonovu reakci při pH 7,5 a pH 4,5.	53
Obrázek 29: Grafické zobrazení vlivu kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové na železem katalyzovanou Fentonovu reakci při pH 7,5 a pH 4,5.	54
Obrázek 30: Grafické zobrazení vlivu kyseliny 3-hydroxy-4-methoxyfenyloctové na železem katalyzovanou Fentonovu reakci při pH 7,5 a pH 4,5.	54
Obrázek 31: Grafické zobrazení vlivu kyseliny 4-hydroxy-3-methoxyfenyloctové/ kyseliny homovanilové na železem katalyzovanou Fentonovu reakci při pH 7,5 a pH 4,5.	55

11 POUŽITÁ LITERATURA

1. GREENWOOD, N. N. a EARNSHAW, A. *Chemistry of the elements*. 2. vyd. Amsterdam: Elsevier, 1997. ISBN 978-0-7506-3365-9.
2. CHEMISTRY TALK. Iron Element. *ChemistryTalk.org*. Online. 2024. Dostupné z: <https://chemistrytalk.org/iron-element/> [cit. 2024-11-02].
3. VYORAL, D. a PETRÁK, J. Metabolismus železa a jeho regulace. Online. *Vnitřní lékařství*. 2012, roč. 89, č. 15, s. 287–293. ISSN 0042-7744. Dostupné z: <https://www.casopisvnitrnilekarstvi.cz/pdfs/vnl/2012/89/15.pdf>. [cit. 2025-11-03].
4. GEISSLER, C. a SINGH, M. Iron, Meat and Health. Online. *Nutrients*. 2011, roč. 3, č. 3, s. 283-316. ISSN 2072-6643. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nu3030283>. [cit. 2025-11-07].
5. ANDERSON, G. J. a VULPE, Ch. D. Mammalian iron transport. Online. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2009, roč. 66, č. 20, s. 3241-3261. ISSN 1420-682X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0051-1>. [cit. 2025-11-04].
6. CHIFMAN, J.; LAUBENBACHER, R. a TORTI, S. V. A Systems Biology Approach to Iron Metabolism. Online. In: COREY, Seth Joel; KIMMEL, Marek a LEONARD, Joshua N. (ed.). *A Systems Biology Approach to Blood*. Advances in Experimental Medicine and Biology. New York, NY: Springer New York, 2014, s. 201-225. ISBN 978-1-4939-2094-5. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2095-2_10. [cit. 2025-11-04].
7. ANDERSON, G. J. a FRAZER, D. M. Current understanding of iron homeostasis. Online. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2017, roč. 106, s. 1559S-1566S. ISSN 00029165. Dostupné z: <https://doi.org/10.3945/ajcn.117.155804>. [cit. 2025-11-06].
8. ANDERSON, G. J. Mechanisms of iron loading and toxicity. Online. *American Journal of Hematology*. 2007, roč. 82, č. S12, s. 1128-1131. ISSN 03618609. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/ajh.21075>. [cit. 2025-11-07].
9. GALARIS, D.; BARBOUTI, A. a PANTOPOULOS, K. Iron homeostasis and oxidative stress: An intimate relationship. Online. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* -

- Molecular Cell Research*. 2019, roč. 1866, č. 12. ISSN 01674889. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2019.118535>. [cit. 2025-11-07].
10. KNUTSON, M. a WESSLING-RESNICK, M. Iron Metabolism in the Reticuloendothelial System. Online. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2008, roč. 38, č. 1, s. 61-88. ISSN 1040-9238. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/713609210>. [cit. 2025-11-07].
 11. DUTT, S.; HAMZA, I.; BARTNIKAS, T. B. Molecular mechanisms of iron and heme metabolism. Online. *Annual Review of Nutrition*. 2022, roč. 42, č. 1, s. 311–335. ISSN 0199-9885. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-062320-112625>. [cit. 2025-11-13].
 12. ŠIMEK, M. Nové poznatky o metabolismu železa. Online. *Vnitřní lékařství*. 2005, 51(3), s. 189–193. ISSN 0042-7744. Dostupné z: <https://www.casopisvnitrnilekarstvi.cz/pdfs/vnl/2005/03/16.pdf>. [cit. 2025-11-12].
 13. ROEMHILD, K.; VON MALTZAHN, F.; WEISKIRCHEN, R.; KNÜCHEL, R.; VON STILLFRIED, S. et al. Iron metabolism: pathophysiology and pharmacology. Online. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2021, roč. 42, č. 8, s. 640-656. ISSN 01656147. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tips.2021.05.001>. [cit. 2025-11-20].
 14. CAMASCHELLA, C. Iron deficiency. Online. *Blood*. 2019, roč. 133, č. 1, s. 30-39. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <https://doi.org/10.1182/blood-2018-05-815944>. [cit. 2025-11-20].
 15. GATTERMANN, N.; MUCKENTHALER, M. U.; KULOZIK, A. E.; METZGEROTH, G. a HASTKA, J. The evaluation of iron deficiency and iron overload. Online. *Deutsches Ärzteblatt international*. 2021. ISSN 1866-0452. Dostupné z: <https://doi.org/10.3238/arztebl.m2021.0290>.
 16. NOVOTNÝ, J. Poruchy metabolismu železa II. Online. *Vnitřní lékařství*. 2005, 51(9), s. 677–684. ISSN 0042-7744. Dostupné z: <https://casopisvnitrnilekarstvi.cz/pdfs/vnl/2005/09/13.pdf>. [cit. 2025-11-20].
 17. PENKA, M. a SLAVÍČKOVÁ, E. *Hematologie a transfuzní lékařství*. I, Hematologie. 1. vyd. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3459-0. Dostupné také

- z: <https://www.bookport.cz/kniha/hematologie-a-transfuzni-lekarstvi-i-540/>.
[cit. 2025-11-21].
18. ČERMÁK, J. Přetížení železem – novinky v patogenezi a léčbě. Online. *Vnitřní lékařství*. 2009, roč. 55, č. 12, s. 1071–1077. ISSN 0042-773X. Dostupné z: <https://www.casopisvnitrnilekarstvi.cz/pdfs/vnl/2009/88/12.pdf>. [cit. 2025-12-01].
 19. CORRADINI, E.; BUZZETTI E. a PIETRANGELO A. Genetic iron overload disorders. Online. *Molecular Aspects of Medicine*. 2020, roč. 75, s. 100896. ISSN 0098-2997. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2020.100896>. [cit. 2025-12-01].
 20. PIETRANGELO, A. Hereditary hemochromatosis. Online. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2006, roč. 1763, č. 7, s. 700-710. ISSN 01674889. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.05.013>. [cit. 2025-01-05].
 21. HORÁK, J. Doporučený postup ČHS pro diagnostiku a léčbu genetické (hereditární) hemochromatózy. Zpracováno: Prof. MUDr. Jiří Horák, I. interní klinika 3. LF UK a FNKV Praha. Online. 2010 Dostupné z: <https://www.ces-hep.cz/file/326/doporuceny-postup-chs-hemochromatoza.pdf> [cit. 2025-01-05].
 22. KONO, S. a MIYAJIMA, H. Molecular and pathological basis of aceruloplasminemia. Online. *Biological Research*. 2006, roč. 39, č. 1, s. 15–23. ISSN 0716-9760. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-97602006000100003>. [cit. 2025-01-05].
 23. MARCHI, G.; BUSTI, F.; LIRA ZIDANES, A.; CASTAGNA, A. a GIRELLI, D. Aceruloplasminemia: A Severe Neurodegenerative Disorder Deserving an Early Diagnosis. Online. *Frontiers in Neuroscience*. 2019, roč. 13. ISSN 1662-453X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00325>. [cit. 2025-01-09].
 24. MLADĚNKA, P.; HRDINA, R.; HÜBL, M. a ŠIMŮNEK, T. The Fate of Iron in The Organism and Its Regulatory Pathways. Online. *Acta Medica (Hradec Kralove, Czech Republic)*. 2005, roč. 48, č. 3-4, s. 127-135. ISSN 1211-4286. Dostupné z: <https://doi.org/10.14712/18059694.2018.40>. [cit. 2025-02-01].

25. MARTINS, A. C.; ALMEIDA, J. I.; LIMA, I. S.; KAPITÃO, A. S. a GOZZELINO, R. Iron Metabolism and the Inflammatory Response. Online. *IUBMB Life*. 2017, roč. 69, č. 6, s. 442-450. ISSN 1521-6543. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/iub.1635>. [cit. 2025-01-09].
26. ĎURAČKOVÁ, Z. Some Current Insights into Oxidative Stress. Online. *Physiological Research*. 2009, s. 459-469. ISSN 1802-9973. Dostupné z: <https://doi.org/10.33549/physiolres.931844>. [cit. 2025-02-11].
27. PHAM-HUY, L. A.; HE, H. a PHAM-HUYC, Ch. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. Online. *International Journal of Biomedical Science*. 2008, roč. 4, č. 2, s. 89-96. ISSN 15509702. Dostupné z: <https://doi.org/10.59566/IJBS.2008.4089>. [cit. 2025-02-11].
28. JOMOVA, K. a VALKO, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. Online. *Toxicology*. 2011, roč. 283, č. 2-3, s. 65-87. ISSN 0300483X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.03.001>. [cit. 2025-02-11].
29. CATAPANO, M. C.; PROTTI, M.; FONTANA, T.; MANDRIOLI, R.; MLADĚNKA, P. et al. An Original HPLC Method with Coulometric Detection to Monitor Hydroxyl Radical Generation via Fenton Chemistry. Online. *Molecules*. 2019, roč. 24, č. 17. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules24173066>. [cit. 2025-02-11].
30. WINTERBOURN, Ch. C. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. Online. *Toxicology Letters*. 1995, roč. 82-83, s. 969-974. ISSN 03784274. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(95\)03532-X](https://doi.org/10.1016/0378-4274(95)03532-X). [cit. 2025-02-11].
31. KEHRER, J. P. The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. Online. *Toxicology*. 2000, roč. 149, č. 1, s. 43-50. ISSN 0300483X. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(00\)00231-6](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(00)00231-6). [cit. 2025-03-08].
32. PAGARE, S.; BHATIA, M.; TRIPATHI, N.; BANSAL, Y. K. Secondary Metabolites of Plants and their Role: Overview. Online. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*. 2015, roč. 9, č. 3, s. 293–304. ISSN 2230-7303. Dostupné z: <https://www.indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:ctbp&volume=9&issue=3&article=011&type=pdf>. [cit. 2025-03-08].

33. SAMANTA, A.; DAS, G. a DAS, S. K. Roles of Flavonoids in Plants. Online. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Technology*. 2011, roč. 6, č. 1, s. 12–35 ISSN 0975-0525. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/279499208_Roles_of_flavonoids_in_Plants [cit. 2025-03-08].
34. PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D. a CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview. Online. *Journal of Nutritional Science*. 2016, roč. 5. ISSN 2048-6790. Dostupné z: <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>. [cit. 2025-03-08].
35. VISKUPIČOVÁ, J.; ONDREJOVIČ, M. a ŠTURDÍK, E. Bioavailability and metabolism of flavonoids. Online. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2008, roč. 47, č. 4, s. 151–162. ISSN 1336-8672. Dostupné z: <https://www.vup.sk/resources/bulletin/jfnr-2008-4-p151-162-viskupicova.pdf> [cit. 2025-03-08].
36. LIU, W.; FENG, Y.; YU, S.; FAN, Z.; LI, X. et al. The Flavonoid Biosynthesis Network in Plants. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, roč. 22, č. 23. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms222312824>. [cit. 2025-03-08].
37. PRABHU, S.; MOLATH, A.; CHOKSI, H.; KUMAR, S. a MEHRA, R. Classifications of polyphenols and their potential application in human health and diseases. Online. *International Journal of Physiology, Nutrition and Physical Education*. 2021, roč. 6, č. 1, s. 293-301. ISSN 24560057. Dostupné z: <https://doi.org/10.22271/journalofsport.2021.v6.i1e.2236>. [cit. 2025-03-09].
38. TERAHARA, N. Flavonoids in Foods: A Review. Online. *Natural Product Communications*. 2015, roč. 10, č. 3, s. 521–528. ISSN 1934-578X. Dostupné z: <https://journals.sagepub.com/doi/epdf/10.1177/1934578X1501000334> [cit. 2025-03-09].
39. SHEN, N.; WANG, T.; GAN, Q.; LIU, S.; WANG, L. et al. Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. Online. *Food Chemistry*. 2022, roč. 383. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132531>. [cit. 2025-03-12].
40. KUMAR, S.; PANDEY, A. K.; LU, K. P. a SASTRE, J. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. Online. *The Scientific World Journal*.

- 2013, roč. 2013, č. 1. ISSN 2356-6140. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2013/162750>. [cit. 2025-03-12].
41. COOK, N. Flavonoids? Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. Online. *Journal of the European Ceramic Society*. 2004, s. 66-76. ISSN 09552219. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(95\)00168-9](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(95)00168-9). [cit. 2025-03-12].
42. DIAS, M. C.; PINTO, D. C. G. A. a SILVA, A. M. S. Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity. Online. *Molecules*. 2021, roč. 26, č. 17. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules26175377>. [cit. 2025-03-12].
43. YANG, B.; LIU, H.; YANG, J.; GUPTA, V. K. a JIANG, Y. New insights on bioactivities and biosynthesis of flavonoid glycosides. Online. *Trends in Food Science & Technology*. 2018, roč. 79, s. 116-124. ISSN 09242244. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.006>. [cit. 2025-03-12].
44. CHEN, S.; WANG, X.; CHENG, Y.; GAO, H. a CHEN, X. A Review of Classification, Biosynthesis, Biological Activities and Potential Applications of Flavonoids. Online. *Molecules*. 2023, roč. 28, č. 13. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules28134982>. [cit. 2025-03-14].
45. ZHUANG, W.-B.; LI, Y.-H.; SHU, X.-Ch.; PU, Y.-T.; WANG, X.-J. et al. The Classification, Molecular Structure and Biological Biosynthesis of Flavonoids, and Their Roles in Biotic and Abiotic Stresses. Online. *Molecules*. 2023, roč. 28, č. 8. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules28083599>. [cit. 2025-03-14].
46. PYRZYNSKA, K. Hesperidin: A Review on Extraction Methods, Stability and Biological Activities. Online. *Nutrients*. 2022, roč. 14, č. 12. ISSN 2072-6643. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nu14122387>. [cit. 2025-04-05].
47. SINGLA, R. K.; DUBEY, A. K.; GARG, A.; SHARMA, R. K.; FIORINO, M. et al. Natural Polyphenols: Chemical Classification, Definition of Classes, Subcategories, and Structures. Online. *Journal of AOAC International*. 2019, roč. 102, č. 5, s. 1397-1400. ISSN 1060-3271. Dostupné z: <https://doi.org/10.5740/jaoacint.19-0133>. [cit. 2025-03-14].

48. BRODOWSKA, K. M. Natural flavonoids: classification, potential role, and application of flavonoid analogues. Online. *European Journal of Biological Research*. 2017, roč. 7, č. 2, s. 108–123. ISSN 2449-8955. Dostupné z: <https://zenodo.org/record/545778> [cit. 2025-03-14].
49. FALCONE FERREYRA, M. L.; RIUS, S. P. a CASATI, P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. Online. *Frontiers in Plant Science*. 2012, roč. 3. ISSN 1664-462X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00222>. [cit. 2025-03-15].
50. WILLIAMSON, G. a CLIFFORD, M. N. Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity? Online. *British Journal of Nutrition*. 2010, roč. 104, č. S3, s. S48-S66. ISSN 0007-1145. Dostupné z: <https://doi.org/10.1017/S0007114510003946>. [cit. 2025-03-19].
51. HOLLMAN, P. C. H. Absorption, Bioavailability, and Metabolism of Flavonoids. Online. *Pharmaceutical Biology*. 2009, roč. 42, č. sup1, s. 74-83. ISSN 1388-0209. Dostupné z: <https://doi.org/10.3109/13880200490893492>. [cit. 2025-03-18].
52. MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, Ch.; RÉMÉSY, Ch. a JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. Online. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2004, roč. 79, č. 5, s. 727-747. ISSN 00029165. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>. [cit. 2025-03-18].
53. THILAKARATHNA, S. a RUPASINGHE, H. Flavonoid Bioavailability and Attempts for Bioavailability Enhancement. Online. *Nutrients*. 2013, roč. 5, č. 9, s. 3367-3387. ISSN 2072-6643. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nu5093367>. [cit. 2025-03-20].
54. AL-ISHAQ, R. K.; LISKOVA, A.; KUBATKA, P. a BÜSSELBERG, D. Enzymatic Metabolism of Flavonoids by Gut Microbiota and Its Impact on Gastrointestinal Cancer. Online. *Cancers*. 2021, roč. 13, č. 16. ISSN 2072-6694. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cancers13163934>. [cit. 2025-03-20].
55. PROCHÁZKOVÁ, D.; BOUŠOVÁ, I. a WILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. Online. *Fitoterapia*. 2011, roč. 82, č. 4, s. 513-523. ISSN 0367326X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.01.018>. [cit. 2025-03-21].

56. HEIM, K. E; TAGLIAFERRO, A. R. a BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. Online. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2002, roč. 13, č. 10, s. 572-584. ISSN 09552863. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00208-5](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5). [cit. 2025-03-21].
57. PIETTA, P.-G. Flavonoids as Antioxidants. Online. *Journal of Natural Products*. 2000, roč. 63, č. 7, s. 1035-1042. ISSN 0163-3864. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/np9904509>. [cit. 2025-03-25].
58. WANG, X.; LI, Y.; HAN, L.; LI, J.; LIU, C. et al. Role of Flavonoids in the Treatment of Iron Overload. Online. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021, roč. 9. ISSN 2296-634X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.685364>. [cit. 2025-04-23].
59. PEI, R.; LIU, X. a BOLLING, B. Flavonoids and gut health. Online. *Current Opinion in Biotechnology*. 2020, roč. 61, s. 153-159. ISSN 09581669. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.12.018>. [cit. 2025-04-01].
60. SAMSONOWICZ, M. Molecular structure of phenyl- and phenoxyacetic acids – spectroscopic and theoretical study. Online. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2014, roč. 118, s. 1086-1097. ISSN 13861425. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.09.127>. [cit. 2025-04-01].
61. LEE, Ch. Y.; SIM, S. M. a CHENG, H. M. Phenylacetic acids were detected in the plasma and urine of rats administered with low-dose mulberry leaf extract. Online. *Nutrition Research*. 2008, roč. 28, č. 8, s. 555-563. ISSN 02715317. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2008.05.001>. [cit. 2025-04-16].
62. WILLIAMSON, G. a CLIFFORD, M. N. A critical examination of human data for the biological activity of phenolic acids and their phase-2 conjugates derived from dietary (poly)phenols, phenylalanine, tyrosine and catecholamines. Online. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2024, s. 1-60. ISSN 1040-8398. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10408398.2024.2410874>. [cit. 2025-04-16].

63. COOK, S. D. An Historical Review of Phenylacetic Acid. Online. *Plant and Cell Physiology*. 2019, roč. 60, č. 2, s. 243-254. ISSN 0032-0781. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcz004>. [cit. 2025-04-02].
64. MAZIK, M. a SEIDEL, P. Synthesis of 2-[(3,4,5-Triphenyl)phenyl]acetic Acid and Derivatives. Online. *Molbank*. 2024, roč. 2024, č. 2. ISSN 1422-8599. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/M1837>. [cit. 2025-04-02].
65. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PubChem. *PubChem: A Comprehensive Resource for Chemical Information*. Online. Bethesda: Nation Library of Medicine, 2025. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> [cit. 2025-04-01].
66. KINDL, H. Biosynthesis and Metabolism of Hydroxyphenylacetic Acids in Higher Plants. Online. *European Journal of Biochemistry*. 1969, roč. 7, č. 3, s. 340-347. ISSN 0014-2956. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1969.tb19614.x>. [cit. 2025-04-03].
67. MEINEKE, I.; DESEL, H.; KAHL, R.; KAHL, G.F. a GUNDERT-REMY, U. Determination of 2-hydroxyphenylacetic acid (2HPAA) in urine after oral and parenteral administration of coumarin by gas-liquid chromatography with flame-ionization detection. Online. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1998, roč. 17, č. 3, s. 487-492. ISSN 07317085. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(97\)00224-0](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(97)00224-0). [cit. 2025-04-03].
68. HAYASHI, K.-I.; DOMBOU, M.; SEKIYA, M.; NAKAJIMA, H.; FUJITA, T. et al. Thermorubin and 2-Hydroxyphenyl Acetic Acid, Aldose Reductase Inhibitors. Online. *The Journal of Antibiotics*. 1995, roč. 48, č. 11, s. 1345-1346. ISSN 0021-8820. Dostupné z: <https://doi.org/10.7164/antibiotics.48.1345>. [cit. 2025-04-03].
69. PIETTA, P. G.; GARDANA, C.; MAURI, P. L.; MAFFEI-FACINO, R. a CARINI, M. Identification of flavonoid metabolites after oral administration to rats of a Ginkgo biloba extract. Online. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1995, roč. 673, č. 1, s. 75-80. ISSN 03784347. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(95\)00252-E](https://doi.org/10.1016/0378-4347(95)00252-E). [cit. 2025-04-17].
70. LIU, Y.; MYOJIN, T.; LI, K.; KURITA, A.; SETO, M. et al. A Major Intestinal Catabolite of Quercetin Glycosides, 3-Hydroxyphenylacetic Acid, Protects the Hepatocytes

- from the Acetaldehyde-Induced Cytotoxicity through the Enhancement of the Total Aldehyde Dehydrogenase Activity. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022, roč. 23, č. 3. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms23031762>. [cit. 2025-04-05].
71. KOLI, R.; ERLUND, I.; JULA, A.; MARNIEMI, J.; MATTILA, P. et al. Bioavailability of Various Polyphenols from a Diet Containing Moderate Amounts of Berries. Online. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010, roč. 58, č. 7, s. 3927-3932. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/jf9024823>. [cit. 2025-04-17].
72. GIMÉNEZ-BASTIDA, J. A.; ZIELINSKI, H.; PISKULA, M.; ZIELINSKA, D. a SZAWARA-NOWAK, D. Buckwheat bioactive compounds, their derived phenolic metabolites and their health benefits. Online. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2017, roč. 61, č. 7. ISSN 1613-4125. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600475>. [cit. 2025-04-05].
73. DIAS, P.; POUROVÁ, J.; VOPRŠALOVÁ, M.; NEJMANOVÁ, I. a MLADĚNKA, P. 3-Hydroxyphenylacetic Acid: A Blood Pressure-Reducing Flavonoid Metabolite. Online. *Nutrients*. 2022, roč. 14, č. 2. ISSN 2072-6643. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nu14020328>. [cit. 2025-04-05].
74. MCKAY, D. L.; CHEN, C.-Y. O.; ZAMPARIELLO, C. A. a BLUMBERG, J. B. Flavonoids and phenolic acids from cranberry juice are bioavailable and bioactive in healthy older adults. Online. *Food Chemistry*. 2015, roč. 168, s. 233-240. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.062>. [cit. 2025-04-17].
75. ZHANG, Z.; LIU, J.; LI, Y.; WANG, Y.; ZHENG, X. et al. 4-Hydroxyphenylacetic Acid, a microbial-derived metabolite of Polyphenols, inhibits osteoclastogenesis by inhibiting ROS production. Online. *International Immunopharmacology*. 2024, roč. 143. ISSN 15675769. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2024.113571>. [cit. 2025-04-06].
76. AN, S.; YAO, Y.; WU, J.; HU, H.; WU, J. et al. Gut-derived 4-hydroxyphenylacetic acid attenuates sepsis-induced acute kidney injury by upregulating ARC to inhibit necroptosis. Online. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular*

- Basis of Disease*. 2024, roč. 1870, č. 1. ISSN 09254439. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2023.166876>. [cit. 2025-04-06].
77. VISSIENNON, C.; NIEBER, K.; KELBER, O. a BUTTERWECK, V. Route of administration determines the anxiolytic activity of the flavonols kaempferol, quercetin and myricetin — are they prodrugs? Online. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2012, roč. 23, č. 7, s. 733-740. ISSN 09552863. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2011.03.017>. [cit. 2025-04-07].
78. ZHAO, H.; JIANG, Z.; CHANG, X.; XUE, H.; YAHEFU, W. et al. 4-Hydroxyphenylacetic Acid Prevents Acute APAP-Induced Liver Injury by Increasing Phase II and Antioxidant Enzymes in Mice. Online. *Frontiers in Pharmacology*. 2018, roč. 9. ISSN 1663-9812. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00653>. [cit. 2025-04-07].
79. NAHAR, L.; RUSSELL, W. R.; MIDDLETON, M.; SHOEB, M.; SARKER, S. D. Antioxidant phenylacetic acid derivatives from the seeds of *Ilex aquifolium*. Online. *Acta Pharmaceutica*. 2005, roč. 55, č. 2, s. 187–193. ISSN 1330-0075. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16179132/>. [cit. 2025-04-17].
80. MUSHTAQ, S.; AGA, M. A.; QAZI, P. H.; ALI, M. N.; SHAH, A. M. et al. Isolation, characterization and HPLC quantification of compounds from *Aquilegia fragrans* Benth: Their in vitro antibacterial activities against bovine mastitis pathogens. Online. *Journal of Ethnopharmacology*. 2016, roč. 178, s. 9-12. ISSN 03788741. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.11.039>. [cit. 2025-04-07].
81. XUE, H.; XIE, W.; JIANG, Z.; WANG, M.; WANG, J. et al. 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid, a microbiota-derived metabolite of quercetin, attenuates acetaminophen (APAP)-induced liver injury through activation of Nrf-2. Online. *Xenobiotica*. 2016, roč. 46, č. 10, s. 931-939. ISSN 0049-8254. Dostupné z: <https://doi.org/10.3109/00498254.2016.1140847>. [cit. 2025-04-08].
82. COLZI, A.; MUSOLINO, A.; IULIANO, A.; FORNAI, F.; BONUCCELLI, U. et al. Identification and Determination of 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyde, the Dopamine Metabolite, in In Vivo Dialysate from Rat Striatum. Online. *Journal of Neurochemistry*. 1996, roč. 66, č. 4, s. 1510-1517. ISSN 0022-3042. Dostupné z: <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.66041510.x>. [cit. 2025-04-07].

83. TUÁREZ-GARCÍA, D. A.; GALVÁN-GÁMEZ, H.; ERAZO SOLÓRZANO, C. Y.; EDISON ZAMBRANO, C.; RODRÍGUEZ-SOLANA, R. et al. Effects of Different Heating Treatments on the Antioxidant Activity and Phenolic Compounds of Ecuadorian Red Dacca Banana. Online. *Plants*. 2023, roč. 12, č. 15. ISSN 2223-7747. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/plants12152780>. [cit. 2025-04-17].
84. BULEANDRĂ, M.; VOICA, L. G.; POPA, D. E.; BADEA, I. A.; IORGULESCU, E. E. et al. Electrochemical Study and Determination of Homovanillic Acid, the Final Metabolite of Dopamine, Using an Unmodified Disposable Electrode. Online. *Molecules*. 2025, roč. 30, č. 2. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules30020369>. [cit. 2025-04-08].
85. WANG, F.; TAN, J.; JIANG, R.; LI, F.; ZHENG, R. et al. DPPH Radical Scavenging Activity of New Phenolics from the Fermentation Broth of Mushroom *Morehella importuna*. Online. *Molecules*. 2023, roč. 28, č. 12. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules28124760>. [cit. 2025-04-18].
86. SAMSONOWICZ, M.; GOŁĘBIEWSKA, E.; WOŁEJKO, E.; WYDRO, U.; ŚWIDERSKI, G. et al. Spectroscopic, Thermal, Microbiological, and Antioxidant Study of Alkali Metal 2-Hydroxyphenylacetates. Online. *Materials*. 2021, roč. 14, č. 24. ISSN 1996-1944. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ma14247824>. [cit. 2025-04-19].
87. CHEN, J.; YANG, J.; MA, L.; LI, J.; SHAHZAD, N. et al. Structure-antioxidant activity relationship of methoxy, phenolic hydroxyl, and carboxylic acid groups of phenolic acids. Online. *Scientific Reports*. 2020, roč. 10, č. 1. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59451-z>. [cit. 2025-04-19].
88. TANG, Y.; NAKASHIMA, S.; SAIKI, S.; MYOI, Y.; ABE, N. et al. 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid is a predominant biologically-active catabolite of quercetin glycosides. Online. *Food Research International*. 2016, roč. 89, s. 716-723. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.09.034>. [cit. 2025-04-20].
89. BISKUP, I.; GOLONKA, I.; GAMIAN, A. a SROKA, Z. Antioxidant activity of selected phenols estimated by ABTS and FRAP methods. Online. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*. 2013, roč. 67, s. 958-963. ISSN 1732-2693. Dostupné z: <https://doi.org/10.5604/17322693.1066062>. [cit. 2025-04-19].